

УДК 612.017.1:616.981.21/.958.7

<http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-2-51-59>

ОЦЕНКА УРОВНЕЙ TREC/KREC У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ

¹Ю. В. Останкова*, ¹М. А. Сайтгалина, ¹Н. А. Арсентьева, ^{1,2}А. А. Тотолян¹Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера,
Санкт-Петербург, Россия²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия**Цель:** оценка уровней TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных лиц.**Материалы и методы.** Материалом для исследования послужили образцы цельной крови, полученные от ВИЧ-инфицированных лиц со сроком инфицирования менее одного года (n=50) и болеющих длительное время, с высокой вирусной нагрузкой и вирусологической неэффективностью применяемой антиретровирусной терапии (АРТ) (n=50). Анализ полученных данных проводили в сравнении со значениями нормы, установленными ранее для взрослых людей разных возрастных групп. Для фенотипирования клеток периферической крови ВИЧ-инфицированных лиц использовали метод многоцветной проточной цитометрии. Для оценки уровней молекул TREC и KREC со всеми образцами тотальной ДНК проводили количественную мультиплексную Real-time ПЦР с использованием набора реагентов «TREC/KREC-AMP PS» (ФБУН НИИ Пастера, СПб), согласно инструкции производителя.**Результаты и их обсуждение.** Определена достоверная прямая корреляция уровней TREC в периферической крови с количеством CD45+CD3+CD19– Т-клеток ($r=0,77$, $p<0,0001$), уровней KREC с количеством CD45+CD3–CD19+ В-клеток ($r=0,79$, $p<0,0001$). Показано достоверное снижение уровней молекул TREC и KREC у ВИЧ-инфицированных лиц с высокой вирусной нагрузкой и вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии (AUC=0,99, Se=0,99, Sp=0,99 для TREC и для KREC).**Заключение.** Оценка уровней молекул TREC и KREC в периферической крови может быть использована для выявления нарушений в функционировании Т- и В-клеточного звеньев иммунитета с целью мониторинга эффективности применяемой АРТ у ВИЧ-инфицированных лиц.**Ключевые слова:** иммунный статус, иммунодефицит, ВИЧ, TREC, KREC, лабораторная диагностика, прогностические маркеры* Контакт: Останкова Юлия Владимировна, shenna1@yandex.ru

EVALUATION OF TREC/KREC LEVELS IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS

¹Yu. V. Ostankova*, ¹M. A. Saitgalina, ¹N. A. Arsentieva, ^{1,2}A. A. Totolian¹Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia²Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia**The aim of this study** was to evaluate TREC and KREC levels in HIV-infected individuals.**Materials and methods.** The study material was whole blood samples obtained from HIV-infected individuals with less than one year of infection (n=50) and long-term patients with high viral load and virological failure of ART (n=50). The obtained data were analyzed in comparison with the norm values established earlier for adults of different age groups. Multicolour flow cytometry was used to phenotype peripheral blood cells of HIV-infected individuals. To assess the levels of TREC and KREC molecules with all total DNA samples, quantitative multiplex Real-time PCR was performed using the reagent kit «TREC/KREC-AMP PS» (Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg), according to the manufacturer's instructions.**Results and discussion.** A reliable direct correlation TREC levels in peripheral blood with the number of CD45+CD3+CD19– Т-cells ($r=0,77$, $p<0,0001$), KREC levels with the number of CD45+CD3–CD19+ В-cells ($r=0,79$, $p<0,0001$) was determined. A significant decrease in the levels of TREC and KREC molecules in HIV-infected individuals with high viral load and virological failure of antiretroviral therapy was shown (AUC=0,99, Se=0,99, Sp=0,99 for TREC and for KREC).

Conclusion. Assessment TREC and KREC molecule levels in peripheral blood can be used to detect abnormalities in the functioning T- and B-cell immunity to monitor the ART effectiveness in HIV-infected individuals.

Keywords: immune status, immunodeficiency, HIV, TREC, KREC, laboratory diagnostics, predictive markers

* Contact: *Ostankova Yulia Vladimirovna, shenna1@yandex.ru*

© Останкова Ю.В. и соавт., 2024 г.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Останкова Ю.В., Сайтгалина М.А., Арсентьева Н.А., Тотолян А.А. Оценка уровней TREC/KREC у ВИЧ-инфицированных лиц // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2024. Т. 16, № 2. С. 51–59, doi: <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-2-51-59>.

Conflict of interest: the authors stated that there is no potential conflict of interest.

For citation: Ostankova Yu.V., Saitgalina M.A., Arsentieva N.A., Totolian A.A. Evaluation of TREC/KREC levels in HIV-infected individuals // *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2024. Vol. 16, No. 2. P. 51–59, doi: <http://dx.doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-2-51-59>.

Введение. Иммунная система человека играет важнейшую роль в борьбе со всеми видами патогенов [1]. Дефекты в любом из компонентов иммунной системы приводят к иммунодефициту. В зависимости от механизмов, лежащих в основе заболевания, иммунодефицит подразделяется на первичный и вторичный. Первичные иммунодефициты обусловлены генетическими дефектами в компонентах иммунной системы и включают в себя дефицит антител, дефицит компонентов системы комплемента, дефект системы фагоцитоза, комбинированный иммунодефицит и т.д. Вторичные иммунодефициты можно определить как временное или стойкое нарушение функций клеток или тканей иммунной системы, вызванное инфекционными процессами, лекарственными препаратами, недостаточностью питания, влиянием окружающей среды и другими факторами [2]. Наиболее значимым вторичным иммунодефицитом является синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), вызванный инфекцией вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [3]. Главной мишенью для ВИЧ являются Т-лимфоциты, несущие на своей поверхности рецептор CD4+, однако могут быть инфицированы и другие клетки гемопоэтического ряда [4].

Один из корцепторов CXCR4, необходимый для проникновения вируса в клетку, экспрессируется на поверхности наивных Т-лимфоцитов и первичных тимоцитов. Таким образом, потенциально ВИЧ может поражать недифференцированные и наивные, только вышедшие на периферию Т-лимфоциты [5]. В отсутствие терапии у ВИЧ-инфицированных лиц развивается Т-клеточная лимфопения. Известно несколько механизмов ее развития: ВИЧ-индуцированный апоптоз, апоптоз,

вызванный неспецифической иммунной активацией, вирусный цитопатический эффект, цитотоксичность Т-клеток по отношению к ВИЧ-инфицированным клеткам и аутофагия. Все эти механизмы в конечном итоге приводят к повышенной восприимчивости организма хозяина к условно-патогенным микроорганизмам. Кроме того, известно, что функция В-клеток может быть нарушена в ходе развития заболевания [6].

У ВИЧ-инфицированных лиц, получающих действенную антиретровирусную терапию (АРТ), в большинстве случаев наблюдают сохранную иммунную функцию [5]. Однако в случае недостаточной приверженности пациента лечению состояние его может быстро ухудшаться за счет стремительного развития заболевания.

Поскольку иммунодефицитные состояния часто связаны с гематологическими проявлениями, такими как периферические цитопении, в частности лимфоцитопении, лабораторная оценка состояния иммунной системы в обязательном порядке включает анализ основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов [7, 8]. Одним из применяемых методов оценки субпопуляций Т- и В-клеток в лабораторной практике является метод проточной цитофлуориметрии — технология распределения клеток в зависимости от их происхождения и морфологических характеристик. Однако этот метод трудоемкий, дорогостоящий, требующий наличия свежей крови пациента. Кроме того, не во всех медицинских учреждениях есть необходимое приборное оснащение и высококвалифицированный персонал, умеющий проводить такой анализ. Разработка более простого и менее трудоемкого способа, который мог бы хотя

бы частично заменить проточную цитофлуориметрию в оценке иммунного статуса ВИЧ-инфицированных лиц, представляется важной задачей. Первым шагом на этом пути является поиск маркеров, изменения которых коррелировали бы с изменением количества целевых клеток по мере развития заболевания. Такими маркерами для оценки Т- и/или В-клеточной лимфопении могут стать уровни молекул кольцевой эписомальной ДНК — эксцизионных колец TREC (T-cell receptor excision circle) и KREC (Kappa-deleting recombination excision circles) в периферической крови больных. Этот подход позволяет выявлять раннюю остановку дифференцировки предшественников лимфоцитов, так как, поскольку формирование молекул TREC и KREC происходит на ранних этапах развития Т- и В-клеток, соответственно, их уровни можно рассматривать как количественный маркер созревающих в центральных лимфоидных органах недифференцированных Т- и В-клеток, а также наивных Т- и В-лимфоцитов, вышедших на периферию [9].

Цель: оценка уровней TREC/KREC у ВИЧ-инфицированных лиц.

Материалы и методы. Материалом служили образцы цельной крови, полученные от ВИЧ-инфицированных лиц со сроком инфицирования менее одного года и ВИЧ-инфицированных лиц, болеющих длительное время (более 1 года), с высокой вирусной нагрузкой и вирусологической неэффективностью применяемой АРТ. Критерием исключения для ВИЧ-инфицированных лиц являлось наличие хронических заболеваний: вирусных гепатитов, туберкулеза, диабета 1-го и 2-го типа, аутоиммунных заболеваний, бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких, онкологических заболеваний и других. Для исключения влияния сопутствующих инфекций на результаты исследования в образцах определяли методом ИФА антитела класса IgM к следующим инфекциям: вирусам гепатитов E и A, простого герпеса 1 и 2 типов, герпеса 8 типа, варицелла зостер, краснухи, кори, паротита, а также к *Treponema pallidum*; антитела класса IgA к следующим инфекциям: *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*. Методом ПЦР в биообразцах определяли нуклеиновые кислоты (НК) вирусов гепатитов B и C, вирусов Эпштейна–Барр, герпеса 6 типа, цитомегаловируса. Материалом для дальнейших исследований

стали 50 образцов, полученных от ВИЧ-инфицированных лиц со сроком инфицирования менее одного года, и 50 образцов от пациентов с ВИЧ, болеющих длительное время, с высокой вирусной нагрузкой и вирусологической неэффективностью применяемой АРТ.

Все процедуры соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». Исследования проводили при письменном согласии пациентов.

Взятие крови осуществляли в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА. Экстракцию тотальной ДНК из лейкоцитарной фракции венозной периферической крови проводили с использованием набора «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, Москва). Для оценки уровней молекул TREC и KREC со всеми образцами тотальной ДНК проводили количественную мультиплексную Real-time ПЦР с использованием набора реагентов «TREC/KREC-AMP PS» (ФБУН НИИ Пастера, СПб), согласно инструкции производителя [10]. Анализ полученных данных проводили в сравнении со значениями нормы, установленными ранее для взрослых людей разных возрастных групп [11].

Для фенотипирования клеток периферической крови использовали метод многоцветной проточной цитометрии. Для выявления популяции Т- и В-лимфоцитов 200 мкл образцов цельной крови окрашивали моноклональными антителами (МКА) меченными флюорохромами CD45RA-FITC (Beckman Coulter, США), CD3-APC-AF750 (Beckman Coulter, США) и CD19-APC/Cy7 (BioLegend, США) соответственно, согласно инструкциям производителей, затем инкубировали, лизировали и промывали. В дальнейшем клетки ресуспендировали в 0,5 мл PBS, содержащего 2% нейтральный забуференный раствор формалина (Sigma-Aldrich, США). Для проведения исследования использовался проточный цитометр Navios (Beckman Coulter, США), оснащенный лазерами с длиной волны 405, 488, 638 нм. Для определения Т-лимфоцитов собирали не менее 20 000 событий. Для В-клеточного звена из каждого образца было собрано не менее 5000 CD19+ В-

клеток. Сопоставление уровней TREC/KREC с результатами фенотипирования клеток проводили, как было показано ранее [12].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5 и Microsoft Excel 2010. Нормальность распределения полученных числовых данных проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициента Спирмена,

$p < 0,0001$. Для параметра KREC площадь под ROC-кривой составила $0,9948 \pm 0,0024$, при 95% ДИ: $0,9900–0,9996$, $p < 0,0001$. При этом показатели чувствительности и специфичности метода стремятся к 1 при анализе TREC ($Se=0,99$, $Sp=0,99$) и при анализе KREC ($Se=0,99$, $Sp=0,99$). Статистически значимых различий между уровнями ДНК TREC и KREC у здоровых людей и у лиц с впервые выявленным ВИЧ со сроком инфицирования менее одного года не установлено (рис. 1).

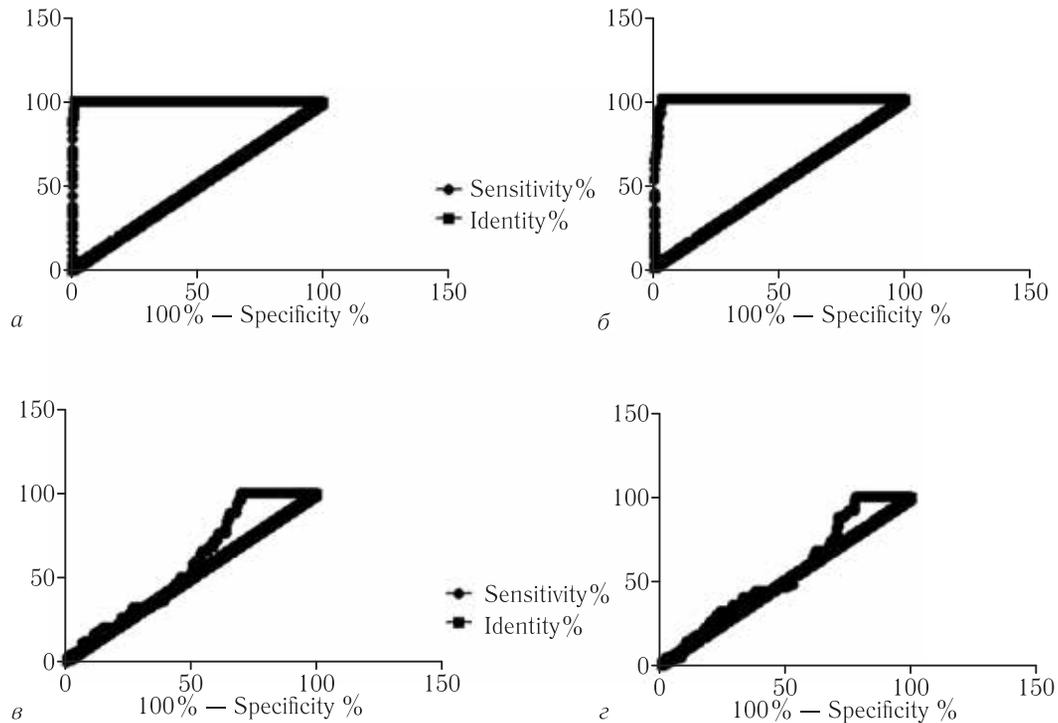


Рис. 1. Изображение ROC-кривых, построенных при сравнении результатов анализа выборок взрослых условно здоровых лиц и ВИЧ-инфицированных больных: инфицированных длительное время, с вирусологической неэффективностью АРТ, по параметрам TREC (а) и KREC (б); инфицированных менее года, по параметрам TREC (в) и KREC (г)

Fig. 1. ROC curves plotted when comparing the results of analyzing samples of healthy adults and HIV-infected patients: infected for a long time, with virological failure of ART, according to TREC (a) and KREC (b) parameters; infected for less than a year, according to TREC (v) and KREC (z) parameters

значение которого оценивали по шкале Чеддока. Для сравнения числовых данных независимых выборок пациентов применяли критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, тест Данна, а также ROC-анализ с вычислением значения площади под ROC-кривой (AUC — Area Under the Curve).

Результаты и их обсуждение. Анализ содержания TREC и KREC в образцах цельной крови, полученной от ВИЧ-инфицированных лиц, показал достоверное снижение уровней целевых аналитов у длительное время инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ по сравнению с контрольной группой. Площадь под ROC-кривой для параметра TREC составила $0,9997 \pm 0,0003$, при 95% ДИ: $0,9989–1,000$,

На рис. 2 и 3 представлен корреляционный анализ уровней молекул TREC и KREC в крови ВИЧ-инфицированных лиц с уровнями CD45+CD3+CD19– и CD45+CD3–CD19+ лимфоцитов соответственно. Корреляционные коэффициенты Спирмена r , обозначенные на рис. 2 и 3, превышают критическое значение критерия Спирмена (0,7), составляя 0,77 ($p < 0,0001$) и 0,79 ($p < 0,0001$) соответственно, что свидетельствует о высокой положительной связи между сравниваемыми параметрами, согласно шкале Чеддока.

Дополнительно была оценена связь уровней TREC, KREC, CD45+CD3+CD19– и CD45+CD3–CD19+ в зависимости от подгрупп ВИЧ-инфицированных лиц (рис. 4 и 5).

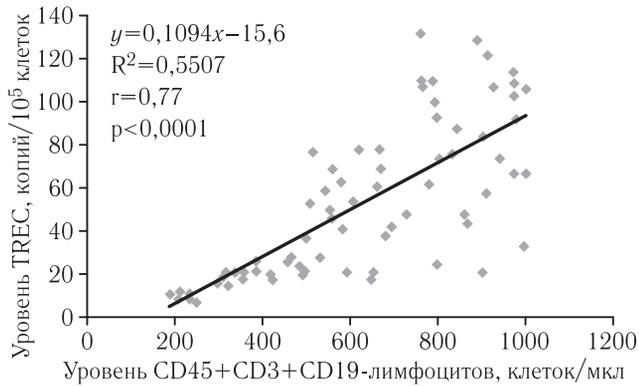


Рис. 2. Корреляция уровней молекул TREC с уровнем CD45+CD3+CD19– лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. На рисунке представлено уравнение аппроксимирующей функции, коэффициент достоверности аппроксимации (R^2), корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p -value

Fig. 2. Correlation of TREC molecule levels with the level of CD45+CD3+CD19– lymphocytes in the blood HIV-infected patients. The figure shows the equation of the approximating function, the approximation reliability coefficient (R^2), the Spearman correlation coefficient (r) and the significance level criterion p -value

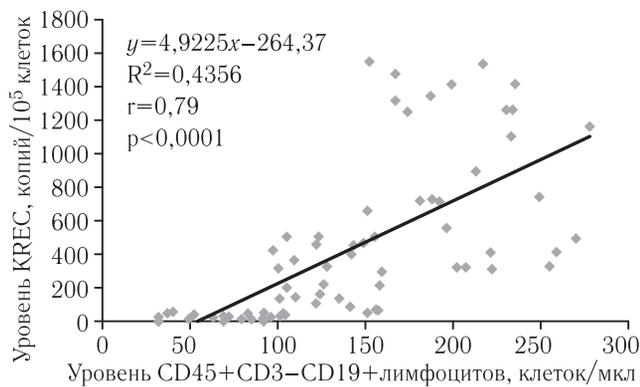


Рис. 3. Корреляция уровней молекул KREC с уровнем CD45+CD3–CD19+ лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. На рисунке представлено уравнение аппроксимирующей функции, коэффициент достоверности аппроксимации (R^2), корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p -value

Fig. 3. Correlation of KREC molecule levels with the level of CD45+CD3–CD19+ lymphocytes in the blood HIV-infected patients. The figure shows the approximating function equation, the approximation reliability coefficient (R^2), the Spearman correlation coefficient (r) and the significance level criterion p -value

Из рис. 4 и 5 видно, что в правой области точечных диаграмм сосредоточены точки, соответствующие группе пациентов, инфицированных менее одного года, не получавших терапию. Для них характерен преимущественно нормальный уровень Т- и В-лимфоцитов в крови и нормальный уровень молекул TREC и KREC. Пациенты с высокой вирусной нагрузкой, инфицированные более одного

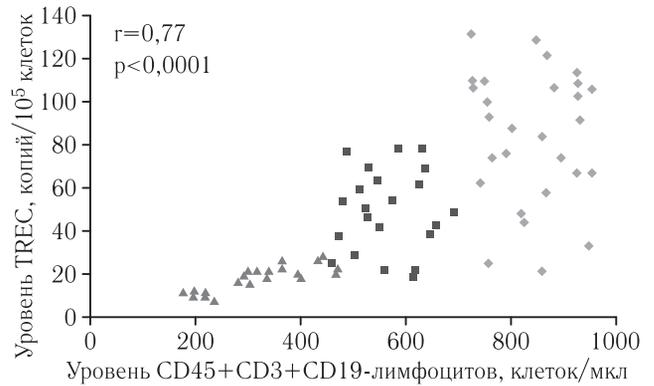


Рис. 4. Группы больных на диаграмме корреляции уровней молекул TREC с уровнем CD45+CD3+CD19– лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. На рисунке представлены корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p -value. Обозначены: ромбы — инфицированы ВИЧ менее 1 года, уровень лимфоцитов в норме или незначительно снижен; квадраты — инфицированы от 1 до 3 лет, получали АРТ (1 или 2 схемы), терапия неэффективна, уровень Т-клеток снижен, В-клеток в норме или снижен незначительно; треугольники — инфицированы от 4 лет и более, длительно получали АРТ (2–4 схемы), терапия неэффективна, уровни Т- и В-клеток значительно снижены

Fig. 4. Patient groups in the diagram correlation TREC molecule levels with the level of CD45+CD3+CD19– lymphocytes in the blood HIV-infected patients. Spearman's correlation coefficient (r) and p -value significance level criterion are presented in the figure. Denoted: rhombuses — infected with HIV for less than 1 year, lymphocyte levels are normal or insignificantly reduced; squares — infected for 1 to 3 years, received ART (1 or 2 regimens), therapy is ineffective, T-cell levels are reduced, B-cell levels are normal or insignificantly reduced; triangles — infected for 4 years and more, long-term ART (2–4 regimens), therapy is ineffective, T- and B-cell levels are significantly reduced

года назад, для которых применяемые схемы АРТ были не эффективны, разделились на две подгруппы. Для больных, длительность инфекции у которых не превышала трех лет, определяли сниженные уровни Т-клеток, при этом уровни В-клеток преимущественно оставались в пределах нормы, уровни TREC и KREC также в норме. У ВИЧ-инфицированных более четырех лет фиксировали значительно сниженные уровни Т- и В-лимфоцитов, а также сниженные уровни молекул TREC и KREC.

Установлены достоверные различия между медианными значениями уровней молекул TREC и KREC, как и между уровнями лимфоцитов в крови у вышеописанных подгрупп ВИЧ-инфицированных лиц (рис. 6, 7).

Созревание и дифференцировка Т- и В-клеток являются органоспецифичными процессами и демонстрируют индивидуальную кинетику лимфоидных органов. В работах зарубежных авторов продемонстрирована корреляция уровней TREC/KREC с количеством периферических наивных Т-

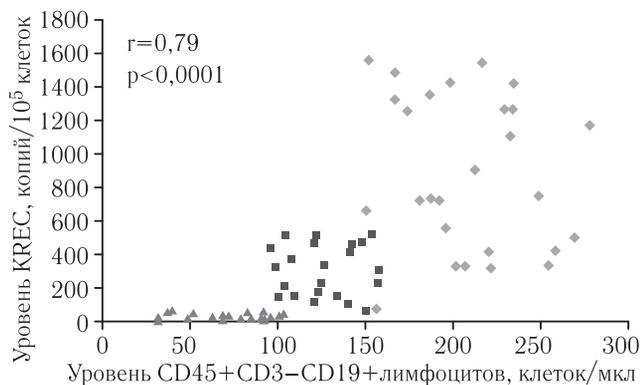


Рис. 5. Группы больных на диаграмме корреляции уровней молекул KREC с уровнем CD45+CD3-CD19+ лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. На рисунке представлены корреляционный коэффициент Спирмена (r) и критерий уровня значимости p-value. Обозначены: ромбы — инфицированы ВИЧ менее 1 года, уровень лимфоцитов в норме или незначительно снижен; квадраты — инфицированы от 1 до 3 лет, получали АРТ (1 или 2 схемы), терапия неэффективна, уровень Т-клеток снижен, В-клеток в норме или снижен незначительно; треугольники — инфицированы от 4 лет и более, длительно получали АРТ (2–4 схемы), терапия неэффективна, уровни Т- и В-клеток значительно снижены

Fig. 5. Groups of patients in the diagram correlation KREC molecule levels with the level of CD45+CD3-CD19+ lymphocytes in the blood HIV-infected patients. Spearman's correlation coefficient (r) and p-value significance level criterion are presented in the figure. Denoted: rhombuses — infected with HIV for less than 1 year, lymphocyte levels are normal or insignificantly reduced; squares — infected for 1 to 3 years, received ART (1 or 2 regimens), therapy is ineffective, T-cell levels are reduced, B-cell levels are normal or insignificantly reduced; triangles — infected for 4 years and more, long-term ART (2–4 regimens), therapy is ineffective, T- and B-cell levels are significantly reduced

и В-клеток, соответственно [13]. Следовательно, одновременная количественная оценка TREC/KREC является практичным методом мониторинга функции тимуса и костного мозга.

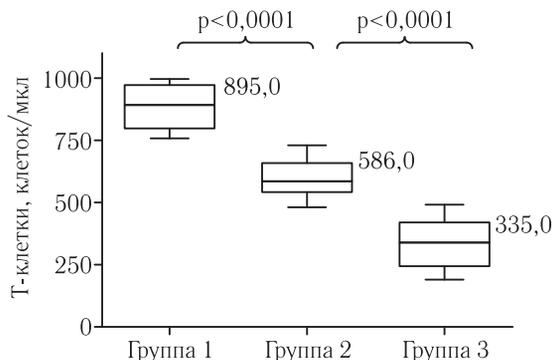
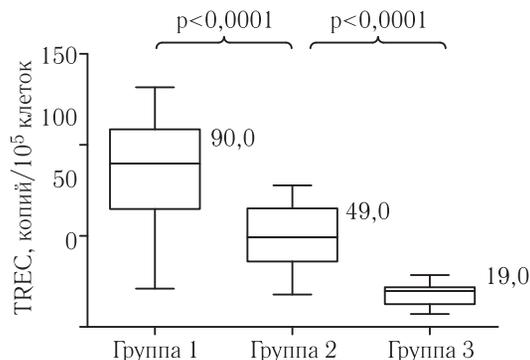


Рис. 6. Уровни Т-лимфоцитов и молекул TREC в крови ВИЧ-инфицированных лиц: группа 1 — недавно инфицированные лица (менее 1 года) с нормальными уровнями лимфоцитов и эксцизионных колец в крови; группа 2 — пациенты, болеющие от 1 до 3 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (1 или 2 схемы), со сниженным уровнем Т-клеток и нормальными уровнями TREC в крови; группа 3 — пациенты, болеющие более 4 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (2–4 схемы), со значительно сниженными уровнями Т-клеток, а также молекул TREC в крови

Fig. 6. Levels of T-lymphocytes and TREC molecules in the blood HIV-infected individuals: group 1 — newly infected individuals (less than 1 year) with normal levels of lymphocytes and excision rings in blood; group 2 — patients sick for 1 to 3 years, with virologic failure of ART (1 or 2 regimens), with reduced T-cell levels and normal TREC levels in blood; group 3 — patients with more than 4 years of disease, with virological failure of ART (2–4 regimens), with significantly reduced levels of T-cells and TREC molecules in the blood

Полученные нами результаты, свидетельствующие о снижении уровней TREC у длительное время инфицированных ВИЧ лиц с вирусологической неэффективностью АРТ, согласуются с данными иностранных коллег, согласно которым ВИЧ-инфекция способна ингибировать функции тимуса и приводить к гибели тимоцитов, при этом количество TREC у пациентов, нуждающихся в АРТ, значительно ниже не только по сравнению с контрольной группой, но и по сравнению с недавно инфицированными лицами с относительно низкой вирусной нагрузкой и сохранным числом клеток CD4+ [14, 15]. Кроме того, количество TREC у ВИЧ-инфицированных пациентов коррелирует с различными клинико-патологическими параметрами (возраст больных, вирусная нагрузка РНК ВИЧ в плазме, количество CD4+ Т-лимфоцитов, процентное содержание CD4+ Т-лимфоцитов) [16, 17]. Предполагается, что изменения уровней TREC и количества наивных Т-клеток у ВИЧ-инфицированных людей объясняется жестким балансом между усилением деления Т-клеток и их гибелью, то есть, неразрывно связаны с ВИЧ-инфекцией. Известно, что уровень TREC у ВИЧ-инфицированных лиц повышается после начала АРТ и, хотя не поднимается до характерных для здоровых людей уровней, достигает плато через 12 месяцев и остается стабильным в течение нескольких лет [16, 17].

В настоящей работе мы не наблюдали высоких уровней TREC у длительно инфицированных ВИЧ больных, находящихся на терапии. По всей видимости, это связано с тем, что исследуемая нами группа была представлена больными с вирусологической неэффективностью АРТ и, соответственно, высокой



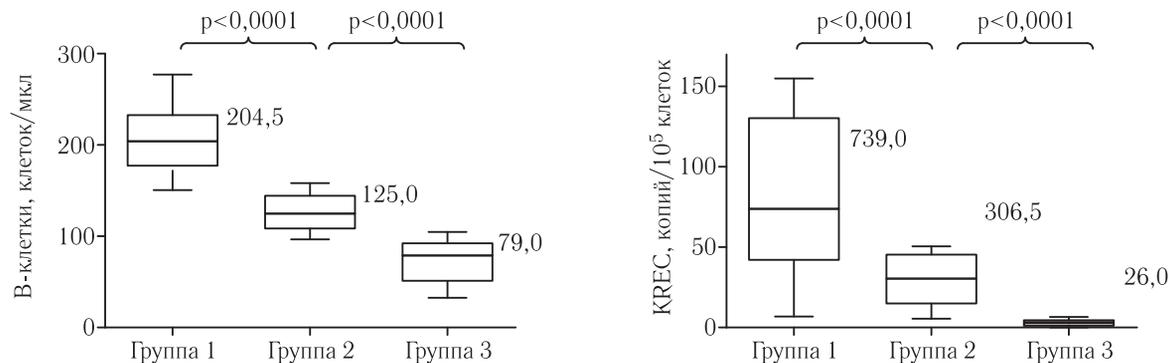


Рис. 7. Уровни В-лимфоцитов и молекул KREC в крови ВИЧ-инфицированных лиц: группа 1 — недавно инфицированные лица (менее 1 года) с нормальными уровнями лимфоцитов и эксцизионных колец в крови; группа 2 — пациенты, болеющие от 1 до 3 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (1 или 2 схемы), со сниженным уровнем В-клеток и нормальными уровнями KREC в крови; группа 3 — пациенты, болеющие более 4 лет, с вирусологической неэффективностью АРТ (2–4 схемы), со значительно сниженными уровнями В-клеток, а также молекул KREC в крови

Fig. 7. Levels of B-lymphocytes and KREC molecules in the blood HIV-infected individuals: group 1 — newly infected individuals (less than 1 year) with normal levels of lymphocytes and excision rings in blood; group 2 — patients sick for 1 to 3 years, with virologic failure of ART (1 or 2 regimens), with reduced B-cell levels and normal KREC levels in blood; Group 3 — patients with more than 4 years of disease, with virological failure of ART (2–4 regimens), with significantly reduced levels of B-cells and KREC molecules in the blood

вирусной нагрузкой, а также преимущественно низким количеством CD4+ клеток. Полученные результаты согласуются с ранее показанными данными, согласно которым количество TREC у пациентов, нуждающихся в АРТ, значительно ниже не только по сравнению с контрольной группой, но и по сравнению с недавно инфицированными лицами с относительно низкой вирусной нагрузкой и сохранным числом клеток CD4+ [15, 16, 17].

Согласно исследованиям некоторых зарубежных коллег, ВИЧ может стать причиной увеличения выработки наивных В-клеток [18], что противоречит полученным нами результатам. Однако выявленное нами снижение уровней KREC у длительное время инфицированных лиц, получавших лечение, согласуется с данными, по которым продукция KREC при АРТ остается неизменной на протяжении 10–12 месяцев, но снижается после продолжительной терапии [16, 17]. В то же время известно, что ВИЧ-инфекция может приводить к дерегуляции экспрессии множества генов в В-клетках [19]. Генерация длительного защитного гуморального иммунитета требует выработки нейтрализующих антител, секретируемых долгоживущими плазматическими клетками, в дополнение к созданию пула В-клеток памяти, на которых оказывает воздействие антиген [20]. Однако гомеостаз компартмента В-клеток памяти нарушается во время естественного течения ВИЧ-инфекции. Это нарушение представляет собой увеличение доли активированных клеток памяти, плазмобластов и истощение В-клеток за счет долгоживущих плазматических клеток [21]. При этом показано, что чем

позже начинается лечение, тем меньше вероятность восстановления сниженной выработки В-клеток костного мозга [22]. Таким образом, выявленное нами снижение уровней KREC у ВИЧ-инфицированных лиц с вирусологической неэффективностью АРТ может быть связано как с длительным воздействием антиретровирусных препаратов на В-клетки, так и с последствиями инфекции.

Итак, количественное определение уровней TREC и KREC в периферической крови можно рассматривать как дополнительный метод мониторинга состояния иммунитета ВИЧ-инфицированных лиц.

Возможность использования уровней TREC/KREC в качестве маркера эффективности используемых антиретровирусных препаратов при ВИЧ-инфекции была подтверждена на примере пяти ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых на протяжении двух лет измеряли количество молекул TREC и KREC, а также вирусную нагрузку. Все пять случаев были представлены лицами со сроком инфицирования менее девяти месяцев, высокой вирусной нагрузкой (>5 млн копий/мл) и нормальными уровнями TREC и KREC на начальном этапе исследования. Всем пациентам было назначено лечение антиретровирусными препаратами по схеме абакавир/зидовудин/ламивудин (ADC/ZDV/ЗТС). Все пациенты сообщали о высокой приверженности терапии. У всех пациентов через 1 месяц приема АРТ вирусная нагрузка снизилась до 5–10 тысяч копий/мл, через 3 месяца приема АРТ до 300–500 копий/мл, при этом уровни TREC и KREC соответствовали возрастным нормам обследуемых. Через

6 месяцев у двух пациентов уровень вирусной нагрузки был менее 50 копий/мл при нормальных уровнях TREC и KREC, в то время как у двух пациентов были снижены уровни TREC, а вирусная нагрузка составила >2000 копий/мл, у одного пациента при вирусной нагрузке менее 50 копий/мл уровень TREC оказался в два раза ниже возрастной нормы. В дальнейшем у двух пациентов количество молекул TREC и KREC оставалось выше граничного значения, а вирусная нагрузка ВИЧ оставалась неопределяемой, у трех пациентов выявляли снижение TREC и подъем вирусной нагрузки более чем до 100 тысяч копий/мл. Таким образом, снижение уровня TREC в периферической крови было определено раньше, чем подъем вирусной нагрузки. Однако статистическая значимость при таком ограниченном количестве наблю-

даемых пациентов невелика и может служить лишь косвенным подтверждением возможности использования оценки уровней TREC/KREC в качестве прогностического маркера развития инфекции.

Заключение. Иммунодефицитные состояния у ВИЧ-инфицированных лиц с высокой вирусной нагрузкой и вирусологической неэффективностью применяемой антиретровирусной терапии затрагивают Т- и В-лимфоцитарные звенья, что проявляется достоверно сниженными уровнями показателей TREC и KREC. Оценка уровней молекул TREC и KREC в периферической крови может быть использована для выявления нарушений в функционировании Т- и В-клеточного звеньев иммунитета с целью мониторинга эффективности применяемой АРТ у ВИЧ-инфицированных лиц.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Sattler S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. Vol. 1003. P. 3–14. doi: 10.1007/978-3-319-57613-8_1.
- Tuano K.S., Seth N., Chinen J. Secondary immunodeficiencies: An overview // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2021. Vol. 127, No. 6. P. 617–626. doi: 10.1016/j.anai.2021.08.413.
- Li K., Zhang Q. Eliminating the HIV tissue reservoir: current strategies and challenges // *Infect. Dis. (Lond.)*. 2024. Vol. 53, No. 3. P. 165–182. doi: 10.1080/23744235.2023.2298450.
- Lu L., Wang J., Yang Q., Xie X., Huang Y. The role of CD38 in HIV infection // *AIDS Res Ther.* 2021. Vol. 18. P. 11. <https://doi.org/10.1186/s12981-021-00330-6>.
- Kazer S.W., Walker B.D., Shalek A.K. Evolution and diversity of immune responses during acute HIV infection // *Immunity*. 2020. Vol. 53, No. 5. P. 908–924.
- Moir S., Malaspina A., Ogwaro K.M., Donoghue E.T., Hallahan C.W., Ehler L.A., Liu S., Adelsberger J., Lapointe R., Hwu P., Baseler M., Orenstein J.M., Chun T.W., Mican J.A., Fauci A.S. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2001. Vol. 98, No. 18. P. 10362–10367. doi: 10.1073/pnas.181347898.
- Sánchez-Ramón S., Bermúdez A., González-Granado L.I., Rodríguez-Gallego C., Sastre A., Soler-Palacín P.; ID-Signal Onco-Haematology Group. Primary and secondary immunodeficiency diseases in oncohaematology: warning signs, diagnosis, and management // *Frontiers in immunology*. 2019. Vol. 10. P. 586. doi: 10.3389/fimmu.2019.00586.
- Seidel M.G. Autoimmune and other cytopenias in primary immunodeficiencies: pathomechanisms, novel differential diagnoses, and treatment // *Blood*. 2014. Vol. 124, No. 15. P. 2337–2344.
- Van Zelm M.C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J. PID comes full circle: applications of V (D) J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders // *Frontiers in immunology*. 2011. Vol. 2. P. 12. doi: 10.3389/fimmu.2011.00012.
- Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // *Инфекция и иммунитет*. 2022. Т. 12, № 5. С. 981–996. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Modified quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, No. 5, pp. 981–996. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039.
- Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег А. Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет // *Медицинская иммунология*. 2022. Т. 24, № 6. С. 1227–1236. [Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Determination of reference values for TREC and KREC in circulating blood of the persons over 18 years. *Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, No. 6, pp. 1227–1236. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587.
- Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Арсентьева Н.А., Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Кащенко В.А., Куликов А.Н., Певцов Д.Э., Станевич О.В., Черных Е.И., Тотолян А.А. Оценка уровней молекул TREC и KREC у больных COVID-19 с разной степенью тяжести течения

- заболевания // *Инфекция и иммунитет*. 2023. Т. 13. № 5. С. 873–884. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Liubimova N.E., Kashchenko V.A., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Stanevich O.V., Chernykh E.I., Totolian A.A. Assessment of trec and krec levels in COVID-19 patients with varying disease severity. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, Vol. 13. No. 5, pp. 873–884. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AOT-16937.
13. Mensen A., Ochs C., Stroux A., Wittenbecher F., Szyska M., Imberti L., Fillatreu S., Uharek L., Arnold R., Dörken B., Thiel A., Scheibenbogen C., Na I.K. Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Journal of translational medicine*. 2013. Vol. 11. P. 1–9. doi: 10.1186/1479-5876-11-188.
14. He S., Zhang Z., Fu Y., Qin C., Li S., Han X., Xu J., Liu J., Jiang Y., Shang H. Thymic Function Is Most Severely Impaired in Chronic HIV-1 Infection, but Individuals With Faster Disease Progression During Early HIV-1 Infection Expressed Lower Levels of RTEs // *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015. Vol. 70, No. 5. P. 472–478. doi: 10.1097/QAI.0000000000000801.
15. Ferrando-Martinez S., De Pablo-Bernal R.S., De Luna-Romero M., De Ory S.J., Genebat M., Pacheco Y.M., Parras F.J., Montero M., Blanco J.R., Gutierrez F., Santos J., Vidal F., Koup R.A., Muñoz-Fernández M.Á., Leal M., Ruiz-Mateos E. Thymic Function Failure Is Associated With Human Immunodeficiency Virus Disease Progression // *Clin Infect Dis*. 2017. Vol. 64, No. P. 1191–1197. doi: 10.1093/cid/cix095.
16. Quiros-Roldan E., Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Gotti D., Torti C., Caimi L., Imberti L. Effects of combined antiretroviral therapy on B- and T-cell release from production sites in long-term treated HIV-1+ patients // *Journal of translational medicine*. 2012. Vol. 10. P. 94. doi: 10.1186/1479-5876-10-94.
17. Drylewicz J., Vriskoop N., Mugwagwa T., de Boer A.B., Otto S.A., Hazenberg M.D., Tesselar K., de Boer R.J., Borghans J.A. Reconciling Longitudinal Naive T-Cell and TREC Dynamics during HIV-1 Infection // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, No. 3. P. e0152513. doi: 10.1371/journal.pone.0152513.
18. Payne H., Chain G., Adams S., Hunter P., Luckhurst N., Gilmour K., Lewis J., Babiker A., Cotton M., Violari A., Gibb D., Callard R., Klein N. Naive B Cell Output in HIV-Infected and HIV-Uninfected Children // *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019. Vol. 35, No. 1. P. 33–39. doi: 10.1089/AID.2018.0170.
19. Shmakova A., Hugot C., Kozhevnikova Y., Schwager Karpukhina A., Tsimailo I., Gérard L., Boutboul D., Oksenhendler E., Szewczyk-Roszczenko O., Roszczenko P., Buzun K., Sheval E.V., Germini D., Vassetzky Y. Chronic HIV-1 Tat action induces HLA-DR downregulation in B cells: A mechanism for lymphoma immune escape in people living with HIV // *J. Med. Virol*. 2024. Vol. 96, No. 2. P. e29423. doi: 10.1002/jmv.29423.
20. Kurosaki T., Kometani K., Ise W. Memory B cells // *Nat Rev Immunol*. 2015. 15(3). P. 149–59. doi: 10.1038/nri3802.
21. Moir S., Fauci A.S. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals // *Immunol Rev*. 2013. Vol. 254, No. 1. P. 207–24. doi: 10.1111/immr.12067.
22. Badura R., Foxall R.B., Ligeiro D., Rocha M., Godinho-Santos A., Trombetta A.C., Sousa A.E. Early ART in Acute HIV-1 Infection: Impact on the B-Cell Compartment // *Front Cell Infect Microbiol*. 2020. Vol. 10. P. 347. doi: 10.3389/fcimb.2020.00347.

Поступила в редакцию / Received by the Editor: 13.03.2024 г.

Авторство: Вклад в концепцию и план исследования — А. А. Толоян, Ю. В. Останкова. Вклад в сбор данных — М. А. Сайдгалина, Ю. В. Останкова, Н. А. Арсентьева. Вклад в анализ данных и выводы — М. А. Сайдгалина, Ю. В. Останкова. Вклад в подготовку рукописи — Ю. В. Останкова, М. А. Сайдгалина, А. А. Толоян.

Сведения об авторах:

Останкова Юлия Владимировна — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14; e-mail: shenna1@yandex.ru; ORCID 0000–0003–2270–8897;

Сайдгалина Мария Александровна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14; e-mail: Sajgalinam@mail.ru; ORCID 0000–0002–7603–3269;

Арсентьева Наталья Александровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14; e-mail: arsentieva_n.a@bk.ru; ORCID 0000–0003–2490–308X;

Толоян Арег Артемович — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; заведующий кафедрой иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14; e-mail: totolian@pasteurorg.ru; ORCID 0000–0003–4571–8799.