

ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.98:578.828.6]-092:612.017.1.064]-022.363-07

Андреа Интроини^{1,2}, Кристоф Ванпуй¹, Андреа Лиско¹, Жан-Шарль Гривель¹, Леонид Марголис¹

ИНТЕРЛЕЙКИН-7 СПОСОБСТВУЕТ ПЕРЕНОСУ ВИЧ-1 НА ЦЕРВИКОВАГИНАЛЬНОЙ ТКАНИ IN VIVO

¹Национальный институт детского здоровья и развития человека им. Юнис Кеннеди-Шривер, Национальные институты здоровья, Бетесда, шт. Мэриленд, США; ²Факультет биомедицинских наук и технологий, Миланский университет, Милан, Италия

В большинстве случаев ВИЧ-1-инфекция передается женщинам во время вагинального полового акта, когда содержащая вирус семенная жидкость попадает на слизистую оболочку шейки матки и влагалища. Семенная жидкость не только переносит ВИЧ-1, но и содержит большое количество биологических факторов, в частности цитокинов, которые могут влиять на передачу ВИЧ-1. Одним из наиболее распространенных цитокинов в семенной жидкости здоровых мужчин является интерлейкин-7 (ИЛ-7), концентрация которого значительно увеличена в семенной жидкости ВИЧ-1-инфицированных лиц. В данной работе мы исследовали потенциальную роль ИЛ-7 в передаче ВИЧ-1 вагинальным путем в системе ex vivo цервикавагинальной ткани человека. Мы смоделировали ситуацию in vivo путем нанесения на цервикавагинальную ткань ВИЧ-1 в сочетании с ИЛ-7, концентрации сравнимой с его концентрацией, в семенной жидкости ВИЧ-1-инфицированных лиц. Мы обнаружили, что ИЛ-7 в значительной степени усилил репликацию вируса в цервикавагинальной ткани, инфицированной ex vivo. Кроме того, мы наблюдали усиление репликации ВИЧ-1 в эксплантатах лимфоидной ткани. Анализ Т-клеток, изолированных из инфицированных тканей, показал, что ИЛ-7 сокращает истощение популяции Т-клеток CD4⁺, предотвращая апоптоз, как свидетельствовало снижение количества клеток с экспрессией апоптотического маркера APO2.7 и усиление экспрессии антиапоптотического белка – В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2). Помимо этого, ИЛ-7 увеличивал фракцию делящихся CD4⁺ Т-клеток, о чем свидетельствовало окрашивание ядерного фактора Ki-67. Высокий уровень содержания ИЛ-7 в семенной жидкости in vivo может влиять на выживание исходного пула ВИЧ-1-инфицированных клеток в слизистой оболочке шейки матки и влагалища на начальных стадиях инфицирования и способствовать локальному размножению и распространению ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: ВИЧ, лимфоциты, интерлейкины, ткани, заражение

A. Introini^{1,2}, C. Vanpouille¹, A. Lisco¹, J.-C. Grivel¹, L. Margolis¹

INTERLEUKIN-7 HIV TRANSMISSION TO CERVICO-VAGINAL TISSUE EX VIVO

¹Eunice Kennedy-Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America, 31 Center Drive Building 31, Room 2A32 Bethesda, MD 20892-2425; ²University of Milan, Via Festa del Perdono, 12 – 20122, Milan, Italy

The majority of HIV-1 infections in women transmit through vaginal intercourse, in which virus-containing semen is deposited on the cervico-vaginal mucosa. Semen is more than a mere carrier of HIV-1, since it contains many biological factors, in particular cytokines, that may affect HIV-1 transmission. The concentration of interleukin (IL)-7, one of the most prominent cytokines in semen of healthy individuals, is further increased in semen of HIV-1-infected men. Here, we investigated the potential role of IL-7 in HIV-1 vaginal transmission in an ex vivo system of human cervico-vaginal tissue. We simulated an in vivo situation by depositing HIV-1 on cervico-vaginal tissue in combination with IL-7 at concentrations comparable with those measured in semen of HIV-1-infected individuals. We found that IL-7 significantly enhanced virus replication in ex vivo infected cervico-vaginal tissue. Similarly, we observed an enhancement of HIV-1 replication in lymphoid tissue explants. Analysis of T cells isolated from infected tissues showed that IL-7 reduced CD4⁺ T cell depletion preventing apoptosis, as shown by the decrease in the number of cells expressing the apoptotic marker APO2.7 and the increase in the expression of the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma (Bcl)-2. Also, IL-7 increased the fraction of cycling CD4⁺ T cells, as evidenced by staining for the nuclear factor Ki-67. High levels of seminal IL-7 in vivo may be relevant to the survival of the founder pool of HIV-1-infected cells in the cervico-vaginal mucosa at the initial stage of infection, promoting local expansion and dissemination of HIV infection.

Key words: HIV, lymphocytes, interleukins, tissues, infection

Введение

В большинстве случаев ВИЧ-1 передается от мужчины к женщине через семенную жидкость при вагинальном половом акте [1]. Сперма при этом служит не только носителем ВИЧ-1, но и содержит большое ко-

личество биологических факторов, которые могут способствовать или препятствовать передаче ВИЧ-1 [2, 3]. Так, например, в семенной жидкости содержатся как различные амилоидогенные пептиды, которые усиливают ВИЧ-инфекцию и, вероятно, способствуют передаче ВИЧ [4, 5], так и катионные полипептиды, угнетающие ВИЧ-инфекцию [6]. Кроме того, семенная жидкость богата разнообразными цитокинами [7], которые могут влиять на процесс передачи ВИЧ-1 [8–11].

Для корреспонденции: Марголис Леонид Борисович, e-mail: margolis@helix.nih.gov

Ранее мы и другие исследователи обнаружили, что в семенной плазме концентрация ИЛ-7, одного из наиболее распространенных цитокинов в сперме здоровых мужчин [7], может превышать его содержание в кровяной плазме более чем в сто раз. Более того, в ходе инфицирования ВИЧ-1 концентрация ИЛ-7 в семенной плазме повышается по сравнению с его концентрацией у неинфицированных лиц [12, 13].

ИЛ-7 играет главную роль в развитии и гомеостазе Т-клеток [14], и в настоящее время производится клиническое испытание возможности применять его для лечения тяжелой лимфопении при лимфоаблативной химио- и радиотерапии, а также при наличии ВИЧ-1-инфекции [15]. В частности, введение ИЛ-7 ВИЧ-1-инфицированным лицам, проходящим антиретровирусное лечение, увеличило у них количество Т-клеток в их организмах [16, 17], хотя у некоторых пациентов наблюдался кратковременный всплеск репликации ВИЧ-1. В этих и других статьях [18, 19] внимание было сконцентрировано на воздействии ИЛ-7 на ВИЧ-1-инфицированных лиц, в то время как о влиянии ИЛ-7 на передачу ВИЧ-1 во время полового акта известно очень мало, несмотря на поразительно высокий уровень ИЛ-7 их в семенной плазме инфицированных мужчин.

В данной работе мы исследовали влияние ИЛ-7 на инфицирование ВИЧ-1 цервикальной и лимфоидной тканей человека *ex vivo*. Мы обнаружили, что ИЛ-7 способствует передаче и распространению ВИЧ-1, предотвращая апоптоз и стимулируя пролиферацию CD4⁺ Т-клеток.

Результаты

Ниже мы описываем влияние рекомбинантного цитокина человека ИЛ-7 на лимфоидную (гланды) и цервикальную ткани человеческого организма, инфицированные ВИЧ-1 *ex vivo*. В частности, мы проанализировали в этих тканях а) репликацию ВИЧ-1 по выделению ВИЧ-1 в культуральную среду и по количеству ВИЧ-1-инфицированных Т-клеток CD4⁺, б) гибель Т-клеток CD4⁺ путем оценки процесса по истощению популяции клеток и экспрессии в этих клетках апоптотического маркера APO2.7 и антиапоптотического белка Bcl-2 и в) пролиферацию CD4⁺ Т-клеток по измерению экспрессии ядерного белка Ki-67. Цервикальные и лимфоидные ткани, инфицированные ВИЧ-1 *ex vivo*, культивировались при концентрации ИЛ-7 в 5 или 25 нг/мл, что сравнимо с концентрацией ИЛ-7 в семенной жидкости ВИЧ-1-инфицированных лиц [13].

Автореферат

В большинстве случаев передача ВИЧ-1 от мужчины к женщине происходит при вагинальном половом акте, в ходе которого вирус переносится в составе семенной жидкости. Для понимания базовых механизмов инфицирования ВИЧ-1 крайне важно выявить главные факторы инфекции ВИЧ-1 в половую систему женщин. Это необходимо для разработки новых стратегий профилактики и сдерживания

ВИЧ-инфекции. Сперма ВИЧ-1-инфицированных лиц обладает высоким содержанием цитокина ИЛ-7, который играет важную роль в жизненном цикле CD4⁺ Т-клеток, являющихся главной мишенью ВИЧ-1. В данном исследовании для изучения влияния ИЛ-7 на передачу и распространение ВИЧ-1 мы использовали систему цервикальных и лимфоидных тканей человека *ex vivo*. Результаты исследования демонстрируют, что при концентрации, сравнимой с содержанием в семенной жидкости ВИЧ-1-инфицированных лиц, ИЛ-7 усиливает репликацию ВИЧ-1, предотвращая гибель CD4⁺ Т-клеток и стимулируя их пролиферацию. Это позволяет инфицированным клеткам дольше продуцировать вирус и увеличивает количество клеток, которые ВИЧ может заразить. Возможно концентрация ИЛ-7 в сперме ВИЧ-1-инфицированных мужчин является главным определяющим фактором эффективной передачи ВИЧ-1 неинфицированной женщине через вагинальный половой акт.

1. ИЛ-7 усиливает репликацию лабораторных штаммов и первичных изолятов ВИЧ-1 в лимфоидных и цервикальных тканях

ИЛ-7 усилил репликацию изолятов ВИЧ-1 в инфицированных лимфоидных тканях *ex vivo* по сравнению с инфицированными контрольными тканями, не обработанными ИЛ-7. Степень усиления зависела от дозы ИЛ-7. Рис. 1, а и 1, в демонстрируют увеличение репликации двух прототипных штаммов ВИЧ-1, ВИЧ-1_{BaL} и ВИЧ-1_{LAI04}, использующих соответственно CCR5 (вариант R5) и CXCR4 (вариант X4), то есть в тканях, обработанных ИЛ-7 в дозах по 5 и 25 нг/мл. Графики с 1С по 1F демонстрируют аналогичное увеличение в опытах с первичными изолятами ВИЧ-1_{96USN20} (клад А, использует CCR5 и CXCR4), ВИЧ-1_{97USNG30} (клад С, использует CCR5), ВИЧ-1_{96USNG31} (клад С, использует CCR5 и CXCR4) и ВИЧ-1_{ME1} (клад В, использует CCR5). Абсолютный совокупный показатель продукции ВИЧ-1 в контрольных образцах различался по тканям от разных доноров и в среднем составил 12,7 ± 3,1 нг/мл для ВИЧ-1_{LAI04} и 7,3 ± 0,9 нг/мл для ВИЧ-1_{BaL}. Для первичных изолятов продукция ВИЧ-1 составила в среднем 25,0 ± 4,6 нг/мл, 3,9 ± 0,4 нг/мл, 0,4 ± 0,1 нг/мл и 3,1 ± 0,5 нг/мл соответственно для ВИЧ-1_{96USN20}, ВИЧ-1_{97USNG30}, ВИЧ-1_{96USNG31} и ВИЧ-1_{ME1}.

В среднем ИЛ-7 в концентрации 5 нг/мл увеличивал продукцию ВИЧ-1_{LAI04} в 2,8 ± 0,3 раза ($n = 3$, $p < 0,01$). Продукция ВИЧ-1_{BaL} также выросла (в 1,7 ± 0,3 раза), однако не достигла уровня статистической значимости ($n = 3$, $p = 0,094$) (см. рис. 1, ж). ИЛ-7 в концентрации 5 нг/мл усиливал репликацию первичных изолятов в 1,7 ± 0,1, 1,4 ± 0,1 и 1,4 ± 0,1 раза соответственно для ВИЧ-1_{96USN20}, ВИЧ-1_{97USNG30} и ВИЧ-1_{ME1} ($n = 7$, $p < 0,05$). Увеличилась также и продукция ВИЧ-1_{96USNG31} (в 1,6 ± 0,4 раза), однако в этом случае не был достигнут уровень статистической значимости ($n = 7$, $p = 0,153$) (рис. 1, ж). Статистически значимое увеличение репликации было отмечено для всех тестируемых штаммов в тканях, обработанных ИЛ-7 в концентрациях 25 нг/мл: для

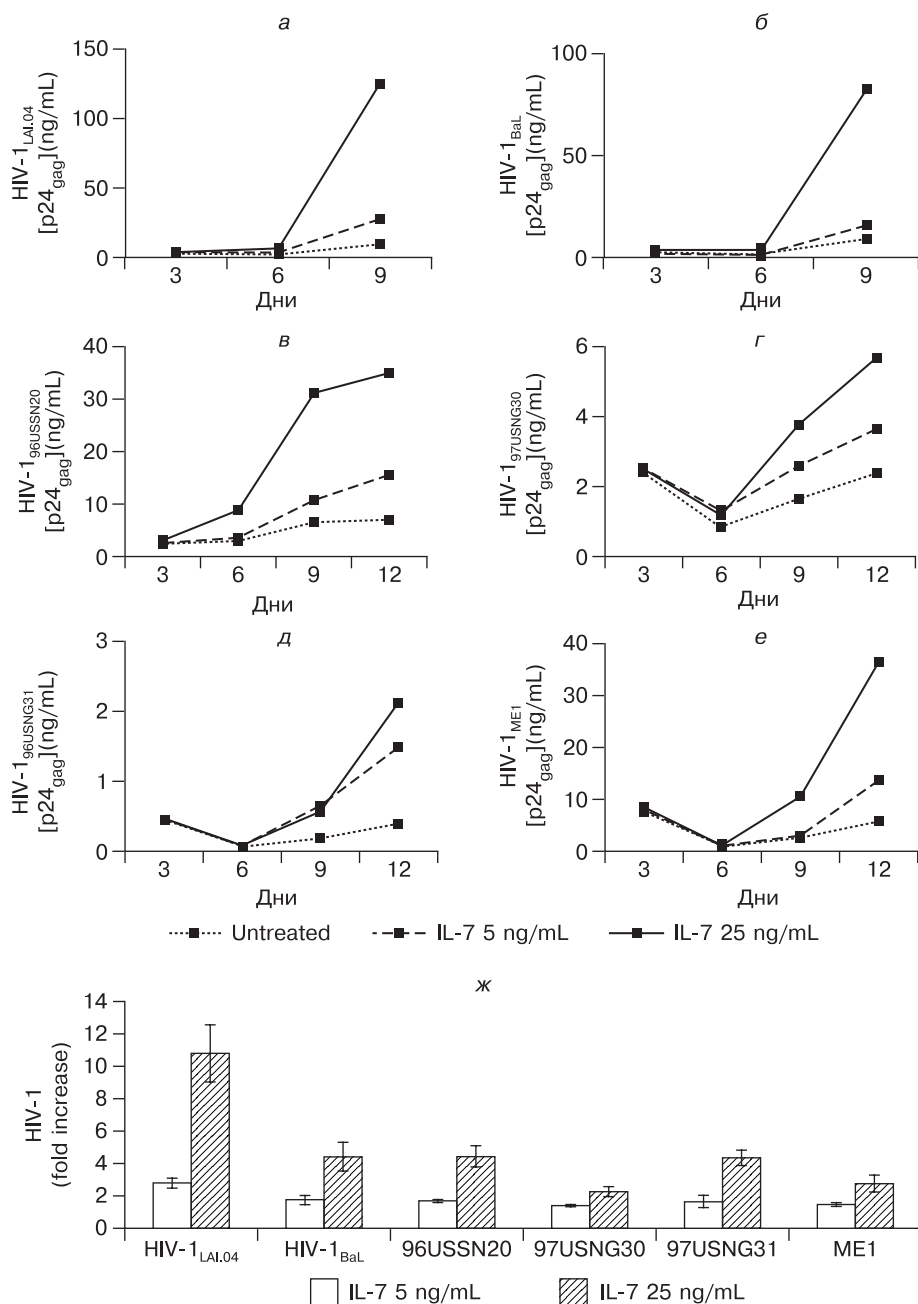


Рис. 1. ИЛ-7 увеличивает продукцию ВИЧ-1 в эксплантатах лимфоидной ткани.

На эксплантаты донорской лимфоидной ткани помещали суспензии, т. е. ВИЧ-1_{LAI.04} и ВИЧ-1_{BaL} соответственно, или первичных изолятов ВИЧ-1_{96USSN20} (клад А, R5/X4), ВИЧ-1_{97USNG30} (клад С, R5), ВИЧ-1_{96USSN20} (клад С, R5/X4) и ВИЧ-1_{ME1} (клад В, R5). Эксплантаты культивировали в течение 9 или 12 дней в присутствии рекомбинантного цитокина человека ИЛ-7 в концентрации 5 или 25 нг/мл или без цитокина. За репликацией ВИЧ-1 следили путем измерения количества р24_{gag} ВИЧ-1, накапливавшегося в культуральных средах за трехдневный период. На графиках представлена динамика выделения р24_{gag} ВИЧ-1 в культуральные среды эксплантатов тканей, инокулированных ВИЧ-1_{LAI.04} (а), ВИЧ-1_{BaL} (б) и первичными изолятами (с в по г). Типичный результат. Каждая точка соответствует общему количеству вируса, выделенного в среду 27 эксплантатами за трехдневный период. На графике г представлены средние показатели роста общего количества р24_{gag} ВИЧ-1, выделенного в культуральные среды эксплантатами тканей, инфицированными различными вариантами ВИЧ-1 и обработанными ИЛ-7 в концентрации 5 нг/мл ($n = 3-7$) или 25 нг/мл ($n = 7-13$), в сравнении с эксплантатами инфицированными, но не подвергавшимися воздействию ИЛ-7 (средние значения \pm стандартная ошибка среднего значения).

ВИЧ-1_{LAI.04} – в $10,8 \pm 1,8$ раза ($n = 13$, $p < 0,001$) и для ВИЧ-1_{BaL} – в $4,4 \pm 0,9$ раза ($n = 9$, $p < 0,001$) (рис. 1, ж), а для первичных изолятов увеличение составило $4,4 \pm 0,6$, $2,2 \pm 0,3$, $4,3 \pm 0,5$ и $2,7 \pm 0,5$ раза соответственно для ВИЧ-1_{96USSN20}, ВИЧ-1_{96USSN20}, ВИЧ-1_{97USNG30} и ВИЧ-1_{ME1} ($n = 7$, $p < 0,005$) (рис. 1, ж).

Кроме того, аналогичное усиление репликации

ВИЧ-1 под действием ИЛ-7 наблюдалось при стократном разведении инокулята вируса. В ходе этих экспериментов общая продукция ВИЧ-1_{LAI.04} и ВИЧ-1_{BaL} в лимфоидных тканях, не подвергнутых воздействию, составила в среднем $4,1 \pm 2,2$ нг/мл и $2,7 \pm 1,3$ нг/мл соответственно. В лимфоидных тканях, обработанных ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл, реплика-

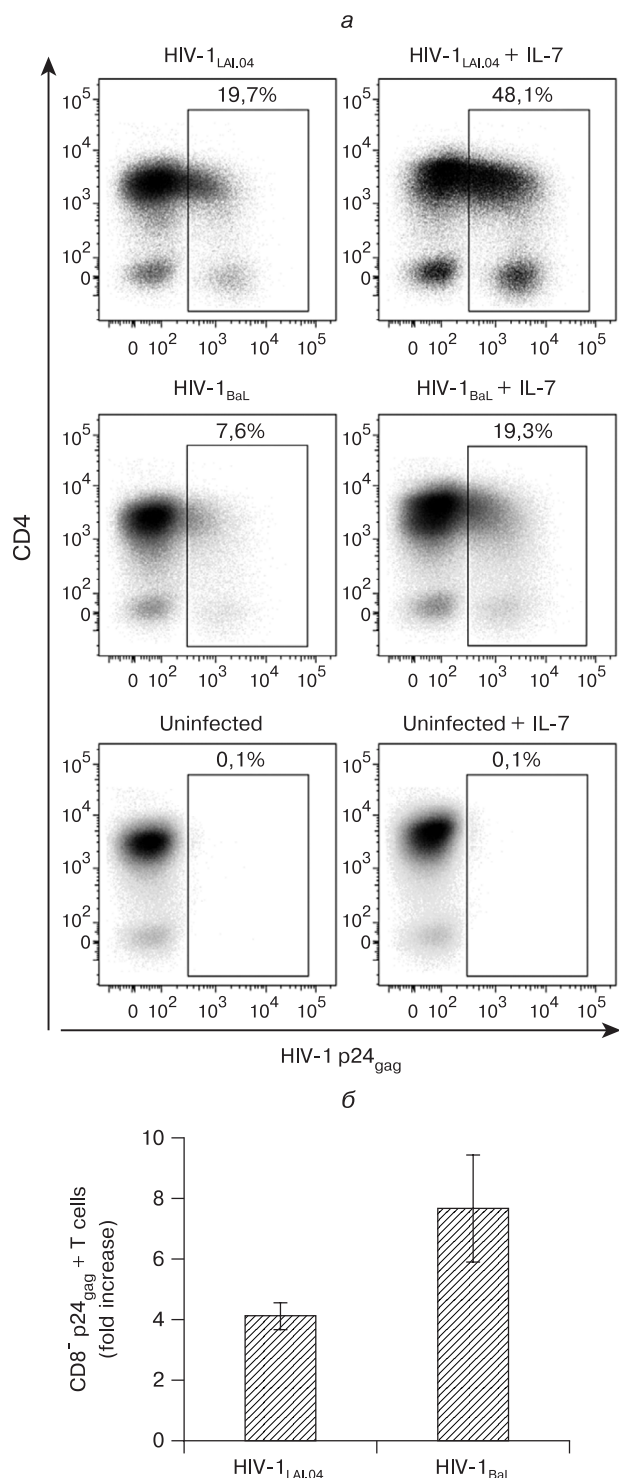


Рис. 2. ИЛ-7 увеличивает число ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток в эксплантатах лимфоидной ткани.

На рис. а представлены результаты инфекции на 9-й день для CD4⁺ Т-клеток, которые были изолированы из эксплантатов ВИЧ-1, подвергнутых или не подвергнутых ИЛ-7 (25 нг/мл). (Типичный результат). Количество ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ (CD8⁺ p24_{gag}⁺) Т-клеток представлено в виде долей в процентах от числа клеток CD3⁺ CD8⁻. Верхняя вставка: ВИЧ-1_{LAI.04}; средняя вставка: ВИЧ-1_{BaL}; нижняя вставка: неинфицированный контрольный образец. На рис. б представлено среднее увеличение числа ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток, которые были изолированы из эксплантатов тканей, инфицированных ВИЧ-1_{LAI.04} ($n = 8$) или ВИЧ-1_{BaL} ($n = 6$) и подвергнутых воздействию ИЛ-7 (25 нг/мл), по сравнению со срезами инфицированных донорских тканей, не подвергнутых воздействию ИЛ-7 (средние значения \pm стандартная ошибка среднего значения).

ция ВИЧ-1 увеличилась в $10,6 \pm 3,4$ раза в случае с ВИЧ-1_{LAI.04} ($n = 6, p < 0,001$) и в $4,2 \pm 2,0$ раза в случае с ВИЧ-1_{BaL} ($n = 6, p < 0,05$). Аналогичный рост наблюдался, когда суспензия ВИЧ-1 была смешана с семенной жидкостью, десятикратно разведенной для снижения ее токсичности *in vitro* [20–22], а затем нанесена на эксплантаты лимфоидной ткани. ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл усилил репликацию ВИЧ-1_{LAI.04} и ВИЧ-1_{BaL} в $7,4 \pm 1,4$ и $5,4 \pm 1,2$ раза соответственно ($n = 3, p < 0,05$).

С усилением репликации ВИЧ-1 согласуется увеличение под действием ИЛ-7 числа ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток, что подтвердилось проточной цитометрией тканевых Т-клеток, окрашенных внутриклеточно на наличие p24_{gag} ВИЧ-1 (рис. 2, а, 2, б). В соответствии с проведенным ранее исследованием [23], для анализа CD4⁺ Т-клеток мы подсчитывали количество CD8⁻ Т-клеток, чтобы учесть Т-клетки, у которых уровень CD4 под действием ВИЧ-1 упал. На 9-й день после инфицирования дозы ИЛ-7 по 25 нг/мл увеличили число ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток (CD8⁻ p24_{gag}⁺) в лимфоидных тканях, инфицированных ВИЧ-1_{LAI.04} и ВИЧ-1_{BaL}, в среднем в $4,1 \pm 0,4$ и $7,7 \pm 1,8$ раза соответственно ($n = 8$ и $6, p < 0,001$) (см. рис. 2, б).

Кроме того, ИЛ-7 усилил репликацию ВИЧ-1_{BaL} в цервикагинальных тканях человеческого организма, которые заражаются R5 ВИЧ-1, а не Х4 ВИЧ-1 [24]. Такое усиление впервые было отмечено на 9-й день после инфицирования стало еще более очевидным на 12-й день (рис. 3а). ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл увеличили продукцию ВИЧ-1_{BaL} в среднем в $5,5 \pm 1,4$ раза ($n = 5, p < 0,01$). ИЛ-7 увеличивал продукцию ВИЧ-1_{BaL} в $2,1 \pm 0,5$ раза, однако такой прирост не достигал уровня статистической значимости ($n = 5, p = 0,129$) (рис. 3, б). Усиление репликации ВИЧ-1 под действием ИЛ-7 происходило даже в ткани, в которой показатель репликации ВИЧ-1_{BaL} без ИЛ-7 составлял не более 75 пг/мл.

Как и в случае с лимфоидными тканями, ИЛ-7 увеличивал число ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток в цервикагинальных тканях, инфицированных R5 ВИЧ-1_{BaL}, что подтвердилось проточной цитометрией Т-клеток ткани, окрашенных внутриклеточно на наличие p24_{gag} ВИЧ-1 (см. рис. 3, в). На 9-й день после инфицирования ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл увеличивал число ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток (CD8⁻ p24_{gag}⁺) в среднем в $3,0 \pm 0,9$ раза ($n = 5, p < 0,05$).

В описанных выше экспериментах ИЛ-7 присутствовал в течение всего периода культивирования. Мы попытались выяснить, достаточно ли подвергнуть ткань кратковременному воздействию ИЛ-7, чтобы усилить репликацию ВИЧ-1. В лимфоидных тканях, подвергнутых воздействию ИЛ-7 в концентрации по 25 нг/мл в течение одной ночи до инфицирования ВИЧ-1_{LAI.04} и после этого культивированных без ИЛ-7, репликация ВИЧ-1 в среднем усиливалась в $3,1 \pm 0,6$ раза ($n = 4, p < 0,05$) (рис. 4). В лимфоидных тканях, подвергнутых предварительному воздействию ИЛ-1 в течение одной ночи и после этого

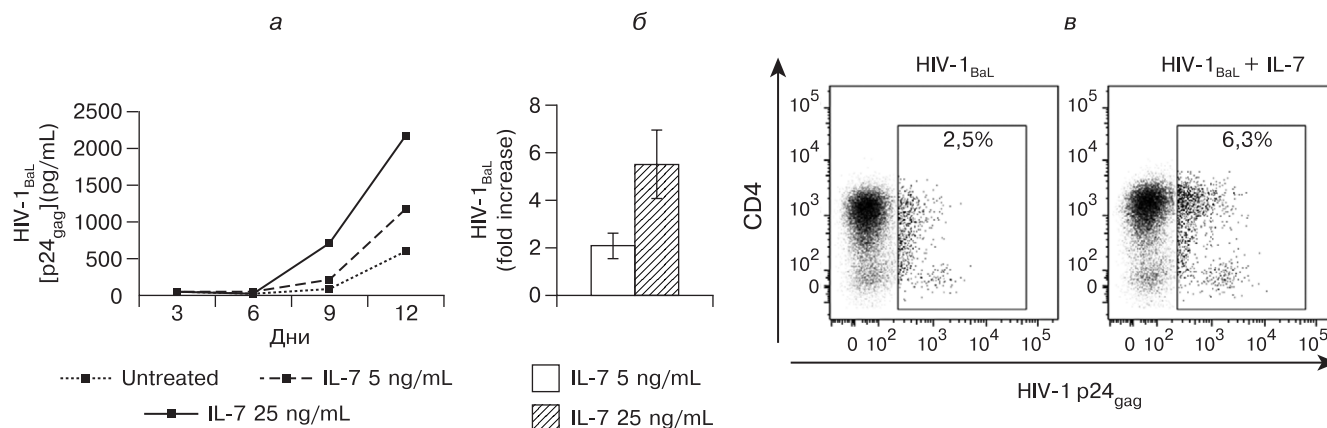


Рис. 3. ИЛ-7 увеличивает продукцию и число ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток в эксплантатах цервикагинальной ткани.

На срезы донорской цервикагинальной ткани были помещены суспензии ВИЧ-1_{BaL} и ткани культивировали в течение 12 дней в отсутствие или в присутствии ИЛ-7 в концентрациях по 5 или 25 нг/мл. На рис. 1, а представлена динамика выделения p24_{gag} ВИЧ-1 в культуральные среды эксплантов ткани с зараженных ВИЧ-1_{BaL}. Каждая точка обозначает общее выделение вируса из эксплантатов 24 тканей за трехдневный период. Типичный результат. На графике б изображен средний прирост общего количества p24_{gag} ВИЧ-1, выделенного в культуральную среду эксплантатами ткани, инфицированными ВИЧ-1_{BaL} и обработанными ИЛ-7 в концентрации 5 или 25 нг/мл, по сравнению со срезами инфицированной донорской ткани без ИЛ-7 (средние значения \pm стандартная ошибка среднего значения, $n = 5$). На графике в представлены результаты соответствующими 9-му дню после инфицирования, CD4⁺ Т-клетки были изолированы из эксплантатов ВИЧ-1-инфицированной ткани, обработанными или не обработанными ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл. Количество ВИЧ-1-инфицированных Т-клеток CD4⁺ (CD8⁺ p24_{gag}⁺) выражено в процентах от числа клеток CD3⁺ CD8⁺.

культивированных в присутствии ИЛ-7 в течение 3 дней после инфицирования, репликация ВИЧ-1_{LAI.04} усилилась в $6,3 \pm 1,4$ раза ($n = 4$, $p < 0,01$) (рис. 4). Аналогичные эксперименты с ВИЧ-1_{BaL} продемонстрировали усиление репликации вируса в $1,6 \pm 0,2$ раза ($n = 5$, $p < 0,05$) при предварительном воздействии на ткани ИЛ-7 и последующем их культивировании без него и усиление в $2,8 \pm 0,8$ раза ($n = 5$, $p < 0,05$) при предварительном воздействии на ткани ИЛ-7 и последующем их культивировании в его присутствии в течение 3-х дней после инфицирования (рис. 4).

ИЛ-7 предотвращает гибель и стимулирует пролиферацию CD4⁺ Т-клеток в ВИЧ-1-инфицированных тканях

Мы проанализировали воздействие ИЛ-7 на размер фракции тканевых CD4⁺ Т-клеток путем подсчета этих клеток методом проточной цитометрии в ВИЧ-1-инфицированных лимфоидных тканях, подвергнутых воздействию ИЛ-7, и в инфицированных донорских тканях, не подвергнутых такому воздействию [25, 26]. ВИЧ-1 сокращал популяцию CD4⁺ Т-клеток: в среднем через 9 дней после инфицирования ВИЧ-1_{LAI.04} уменьшал популяцию Т-клеток CD4⁺ на $48,0 \pm 5,6\%$ по сравнению с неинфицированными контрольными тканями тех же доноров. В донорских тканях, подвергнутых воздействию ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл, потери CD4⁺ Т-клеток были в 3 раза меньше – ВИЧ-1_{LAI.04} сократил их популяцию на $16,7 \pm 7,4\%$ ($n = 7$, $p < 0,0001$). Таким образом, в ВИЧ-1-инфицированных лимфоидных тканях, подвергнутых воздействию ИЛ-7, фракция CD4⁺ Т-клеток оказалась больше, чем в тканях, культивированных без ИЛ-7. Далее мы попытались выяснить, была ли эта разница следстви-

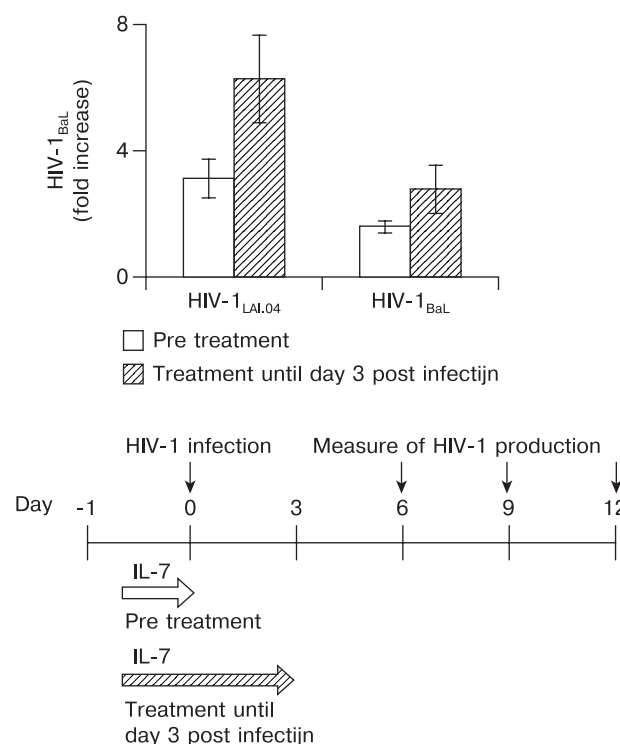


Рис. 4. Для усиления продукции ВИЧ-1 достаточно кратковременного воздействия ИЛ-7.

Эксплантаты лимфоидной ткани обрабатывали ИЛ-7 в течение ночи перед инфицированием ВИЧ-1 или в течение 3-х дней после инфицирования, а затем культивировались без ИЛ-7. На графиках представлен средний прирост общего количества p24_{gag} ВИЧ-1, выделенного в культуральные среды эксплантатов ткани, инфицированных ВИЧ-1_{LAI.04} ($n=4$) или ВИЧ-1_{BaL} ($n=5$) и обработанных ИЛ-7 в концентрации по 25 нг/мл, в сравнении со срезами инфицированной донорской ткани, но не обработанных ИЛ-7 (средние значения \pm стандартная погрешность среднего значения).

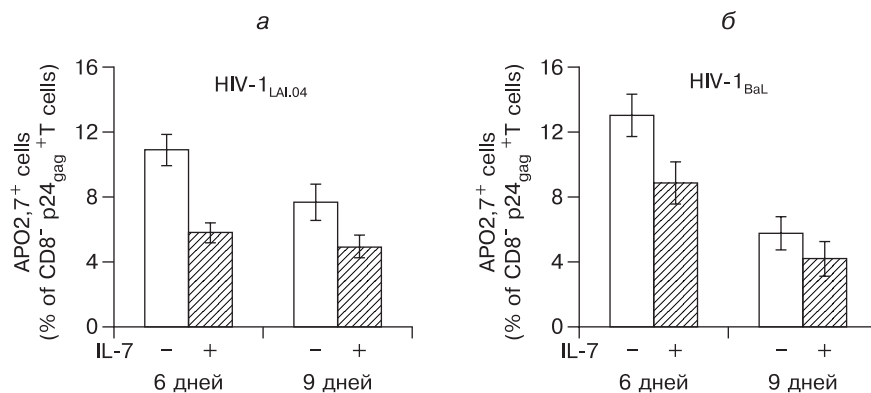


Рис. 5. ИЛ-7 сокращает апоптоз ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток.

На рисунках представлены средние размеры фракций ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток (CD8⁺ p24^{gag}+) экспрессирующих апоптотический маркер АРО2.7. Клетки были изолированы из эксплантатов донорской лимфоидной ткани, инфицированных ВИЧ-1_{LAI.04} ($n=8$) (рис. 5, а) или ВИЧ-1_{Bal} ($n=5$) (рис. 5, б) и обработанных или не обработанных ИЛ-7 в концентрации по 25 нг/мл (средние значения ± стандартная погрешность среднего значения). Количество ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток экспрессирующих АРО2.7+ выражено долей в процентах от общего числа CD8⁺ p24^{gag} Т-клеток.

ем воздействия ИЛ-7 на гибель Т-клеток CD4⁺ или же на их пролиферацию.

Чтобы оценить влияние ИЛ-7 на апоптоз CD4⁺ Т-клеток мы сравнили экспрессию апоптотического маркера АРО2.7 и антиапоптотического белка Bcl-2 в тканях инфицированных ВИЧ-1_{LAI.04} или ВИЧ-1_{Bal}, подвергнутых или не подвергнутых воздействию ИЛ-7. В лимфоидных тканях, обработанных ИЛ-7 (25 нг/мл) на 6-й или 9-й день после заражения ВИЧ в среднем наблюдалось уменьшение фракций инфицированных CD4⁺ Т-клеток (CD8⁺ p24^{gag}+) экспрессирующих АРО2.7, с $10,9 \pm 1,0\%$ до $5,8 \pm 0,6\%$ и с $7,7 \pm 1,1\%$ до $5,0 \pm 0,7\%$ (от числа Т-клеток CD8⁺ p24^{gag}+) соответственно ($n = 8, p < 0,001$) (рис. 5, а). Кроме того, уменьшение фракций ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток экспрессирующих АРО2.7 было отмечено в тканях, инфицированных ВИЧ-1_{Bal}, с $13,0 \pm 1,3\%$ до $8,8 \pm 1,3\%$ и с $5,7 \pm 1,0\%$ до $4,1 \pm 1,1\%$ от числа Т-клеток CD8⁺ p24^{gag} на 6-й и 9-й дни после инфицирования соответственно ($n = 6, p < 0,05$) (рис. 5, б).

Со снижением экспрессии апоптотического маркера АРО2.7 согласуется с повышением под действием ИЛ-7 экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клетках. Поскольку все зрелые Т-клетки экспрессируют Bcl-2 [27], мы сравнили уровни экспрессии этого белка, измерив среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) (рис. 6, а). В инфицированных ВИЧ-1_{LAI.04} лимфоидных тканях ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл повышал экспрессию Bcl-2 в ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клетках в среднем в $2,3 \pm 0,1$ и $2,4 \pm 0,1$ раза соответственно на 6-й и 9-й дни после инфицирования ($n = 8, p < 0,0001$) (см. рис. 6, б). В лимфоидных тканях, инфицированных ВИЧ-1_{Bal}, ИЛ-7 повышал экспрессию Bcl-2 в ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клетках в $2,2 \pm 0,2$ и $2,6 \pm 0,2$ раза соответственно на 6-й и 9-й дни после инфицирования ($n = 6, p < 0,001$) (см. рис. 6, б). Аналогичный эффект наблюдался в цервика-

гинальных тканях, инфицированных ВИЧ-1_{Bal}. На 9-й день после инфицирования ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл повышал экспрессию Bcl-2 в ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клетках в среднем в $1,5 \pm 0,1$ раза по сравнению с донорскими инфицированными тканями, не подвергавшимися воздействию ИЛ-7 ($n = 4, p < 0,05$) (см. рис. 6, в, г).

Как в лимфоидных, так и в цервикагинальных тканях антиапоптотическое воздействие ИЛ-7 распространялось не только на ВИЧ-1-инфицированные, но и на неинфицированные CD4⁺ Т-клетки. В ВИЧ-1-инфицированных лимфоидных тканях, подвергнутых воздействию ИЛ-7 (25 нг/мл), экспрессия Bcl-2 в неинфицированных Т-клетках CD4⁺ (CD8⁺ p24^{gag}-) повышалась в среднем в $2,5 \pm 0,2$ и $2,7 \pm 0,1$ раза соответ-

ственно на 6-й и 9-й дни после инфицирования в случае с ВИЧ-1_{LAI.04} ($n = 8, p < 0,0001$), а в случае с ВИЧ-1_{Bal} – в $2,6 \pm 0,1$ и $3,0 \pm 0,1$ раза соответственно на 6-й и 9-й дни после инфицирования ($n = 6, p < 0,0001$). На 9-й день после инфицирования ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл повышал экспрессию Bcl-2 в CD4⁺ Т-клетках цервикагинальных тканей, инфицированных ВИЧ-1_{Bal}, в среднем в $2,0 \pm 0,3$ раза ($n = 4, p < 0,05$) (см. рис. 6, в, г). Повышение экспрессии Bcl-2 сопровождалось снижением экспрессии АРО2.7. В среднем в ВИЧ-1-инфицированных лимфоидных тканях, обработанных 25 нг/мл ИЛ-7, фракция неинфицированных CD4⁺ Т-клеток экспрессирующих АРО2.7 уменьшилась с $10,8 \pm 0,9\%$ до $6,6 \pm 0,6\%$ и с $11,0 \pm 1,2\%$ до $8,3 \pm 0,8\%$ от числа CD8⁺ p24^{gag} Т-клеток соответственно на 6-й и 9-й дни после инфицирования в случае с ВИЧ-1_{LAI.04} ($n = 8, p < 0,01$), и с $8,0 \pm 0,8\%$ до $5,5 \pm 0,7\%$ и с $4,6 \pm 0,8\%$ до $3,6 \pm 0,8\%$, а в случае с ВИЧ-1_{Bal} – соответственно на 6-й и 9-й дни после инфицирования ($n = 6, p < 0,05$).

Чтобы выяснить, не было ли увеличение числа CD4⁺ Т-клеток в тканях, обработанных ИЛ-7, также связано с пролиферацией клеток, мы подсчитали делящиеся клетки с помощью проточной цитометрии с использованием ядерного белка Ki-67 в качестве маркера пролиферации. На 9-й день после инфицирования 25 нг/мл ИЛ-7 увеличивал в ВИЧ-1-инфицированных лимфоидных тканях фракцию ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток экспрессирующих Ki-67 в среднем в $2,3 \pm 0,6$ раза, в случае с ВИЧ-1_{LAI.04} (с $1,9 \pm 0,3\%$ до $4,0 \pm 1,0\%$ от числа CD8⁺ p24^{gag} Т-клеток ($n = 6, p < 0,05$), а в случае с ВИЧ-1_{Bal} – в $1,5 \pm 0,2$ раза (с $5,2 \pm 0,8\%$ до $7,8 \pm 1,2\%$ от числа CD8⁺ p24^{gag} Т-клеток CD8⁺ p24^{gag}+) ($n = 6, p < 0,05$) (рис. 7, а, б). Кроме того, на 9-й день после инфицирования ИЛ-7 увеличил в этих тканях фракцию неинфицированных CD4⁺ Т-клеток экспрессирующих Ki-67 в среднем в $7,1 \pm 1,2$ раза, (с $0,7 \pm 0,1\%$ до $5,2 \pm$

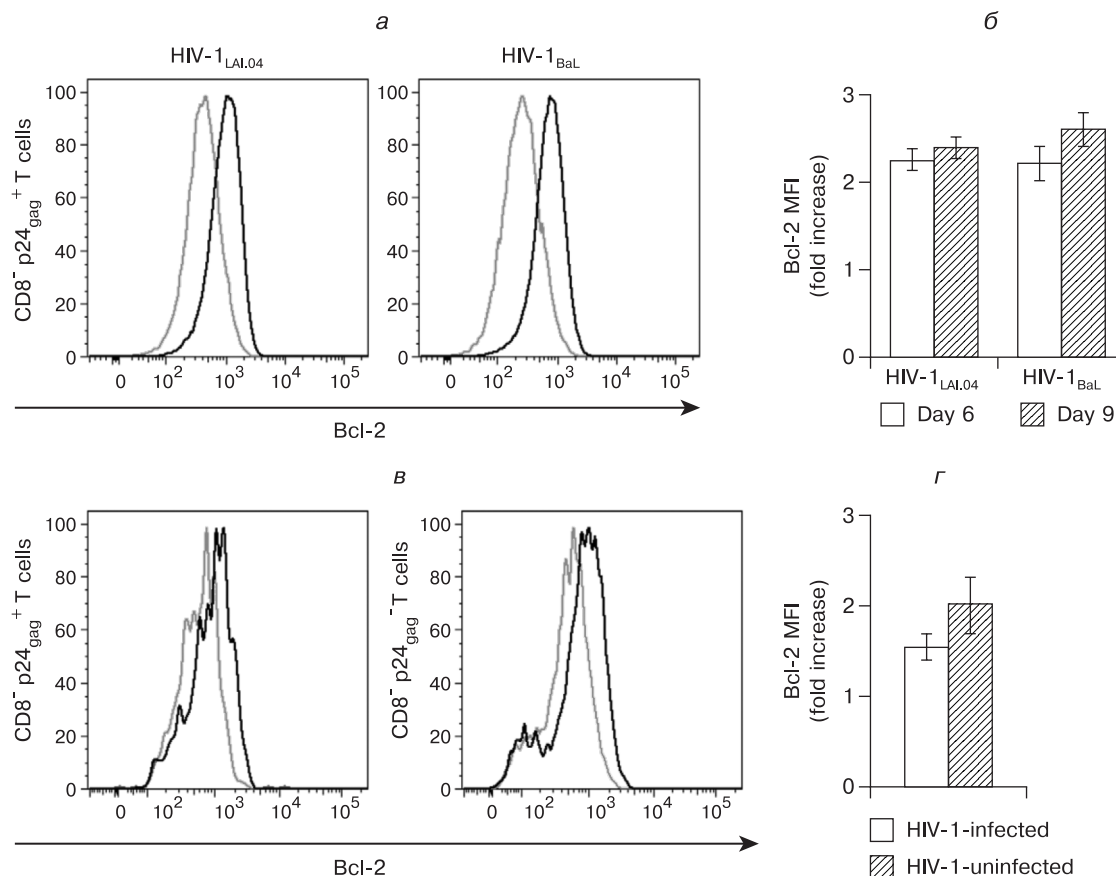


Рис. 6. ИЛ-7 активирует экспрессию Bcl-2.

На рис. 6, а представлены уровни экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 (на 9-й день после инфицирования) в ВИЧ-1-инфицированных $CD4^+$ Т-клетках ($CD8^- p24_{gag}^+$), которые были изолированы из эксплантатов лимфоидной ткани, инфицированных ВИЧ-1_{LAI.04} или ВИЧ-1_{BaL} и обработанных ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл (черная линия), в сравнении с эксплантами инфицированной ткани без ИЛ-7 (красная линия). Типичный результат. Количество Bcl-2 выражено в условных единицах средней интенсивности флюоресценции (СИФ). На рис. 6, б представлено среднее увеличение экспрессии Bcl-2 в ВИЧ-1-инфицированных Т-клетках $CD4^+$, которые были изолированы из эксплантатов лимфоидной ткани, инфицированных ВИЧ-1_{LAI.04} ($n = 8$) или ВИЧ-1_{BaL} ($n = 6$) и обработанных ИЛ-7 в концентрации по 25 нг/мл, в сравнении с эксплантами, инфицированными, но не обработанными ИЛ-7 (средние значения \pm стандартная ошибка среднего значения). На рис. 6, в представлены уровни экспрессии Bcl-2 в ВИЧ-1-инфицированных (на 9-й день после инфицирования) и неинфицированных $CD4^+$ Т-клетках ($CD8^- p24_{gag}^-$), которые были изолированы из эксплантатов цервикальной ткани, инфицированных ВИЧ-1_{BaL} и обработанных ИЛ-7 в сравнении со срезами ткани не обработанных без ИЛ-7 (красная линия). Типичный результат. На рис. 6, г представлено среднее увеличение экспрессии Bcl-2 в ВИЧ-1-инфицированных и неинфицированных Т-клетках $CD4^+$, которые были изолированы из эксплантатов цервикальной ткани, инфицированных ВИЧ-1_{BaL} и обработанных ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл, в сравнении со срезами инфицированной донорской ткани не обработанными ИЛ-7 (средние значения \pm стандартная погрешность среднего значения, $n = 5$).

1,5% от числа Т-клеток $CD8^- p24_{gag}^-$) в случае с ВИЧ-1_{LAI.04} ($n = 6$, $p < 0,0001$), а в случае с ВИЧ-1_{BaL} — в $6,7 \pm 1,2$ раза (с $0,8 \pm 0,1\%$ до $5,9 \pm 1,6\%$ от числа Т-клеток $CD8^- p24_{gag}^-$ ($n = 6$, $p < 0,001$)).

Обсуждение

Передача ВИЧ-1 от мужчины к женщине во время вагинального полового акта представляет собой сложный процесс, исход которого зависит от способности ВИЧ-1 инфицировать клетки-мишени в слизистой оболочке нижних половых путей женщины. Иммунная среда слизистой оболочки женских половых органов играет крайне важную роль на ранних стадиях передачи ВИЧ-1 [28], а сперма активно на эту среду воздействует [2, 3]. В частности, семенная жидкость содержит множество цитокинов, и мы в числе других исследователей обнаружили, что инфицирование ВИЧ приводит к большим изменениям

в системе цитокинов семенной жидкости [12, 13]. Хотя сперма ВИЧ-1-инфицированных лиц характеризуется большим содержанием ИЛ-7 [12,13], о роли этого цитокина в передаче ВИЧ половым путем известно немного.

ИЛ-7 является представителем семейства цитокинов с гамма-цепью, в которое входят ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-21 [29]. ИЛ-7 играет ключевую роль в модуляции развития Т-клеток, а также гомеостаза наивных Т-лейкоцитов периферической крови и Т-клеток памяти [14, 30, 31]. Считается, что основным источником ИЛ-7 в семенной жидкости служит предстательная железа, в которой ИЛ-7 играет важную роль по обеспечению функционирования Т-клеток [32]. В настоящем исследовании мы моделировали ситуацию *in vivo* помещая ВИЧ-1 в сочетании с ИЛ-7, на цервикальную ткань. Концентрация ИЛ-7 была сравнима с его концентраци-

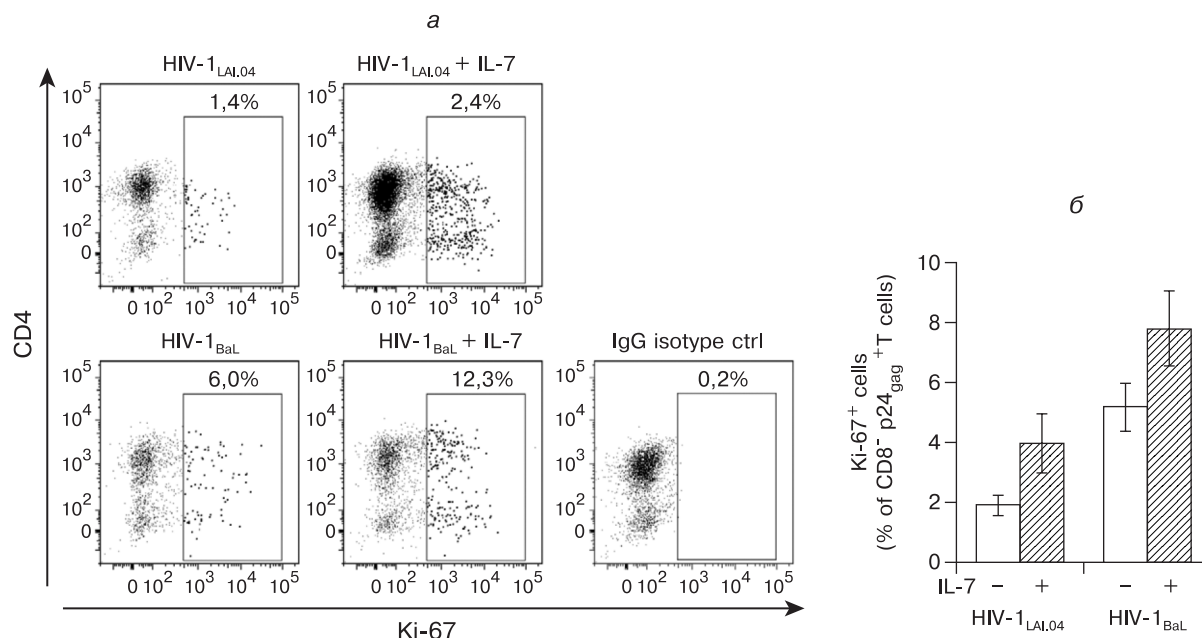


Рис. 7. ИЛ-7 увеличивает пролиферацию ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток.

На рис. 7, а представлены диаграммы для ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток (CD8⁺ p24⁺), (на 9-й день после инфицирования), которые были изолированы из эксплантатов доноров лимфоидной ткани, инфицированных ВИЧ-1_{LAI,04} или ВИЧ-1_{BaL} и обработанных или не обработанных ИЛ-7 в концентрации 25 нг/мл. Количество ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Ki-67⁺ Т-клеток выражено в процентах от общего числа CD8⁺ p24⁺ Т-клеток. На рис. 7, б представлены величина средних фракций ВИЧ-1-инфицированных CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих Ki-67, которые изолированы из эксплантатов донорской лимфоидной ткани, инфицированных ВИЧ-1_{LAI,04} или ВИЧ-1_{BaL} и подвергнутых или не подвергнутых воздействию ИЛ-7 в дозах по 25 нг/мл (средние значения ± стандартная ошибка среднего значения, *n* = 6).

ей, в семенной жидкости ВИЧ-1-инфицированных лиц [13]. Было доказано, что линии эпителиальных клеток, из шейки матки, выделяют ИЛ-7, в то время как линии эпителиальных клеток влагалища и первичных вагинальных эпителиальных клеток ИЛ-7 не продуцируют [33]. В течение 12 дней культивирования мы не выявили ИЛ-7 в культуральных средах эксплантатов цервикагинальной ткани, что позволило нам исследовать роль этого цитокина в передаче ВИЧ-1 *in vivo*.

В своем исследовании мы также использовали лимфоидную (миндалины) ткань *ex vivo* для изучения распространения вируса и вызванного ВИЧ-1 истощения популяции CD4⁺ Т-клеток. Было показано, что ретикулярные стромальные клетки, выделенные из миндалин человека, продуцируют ИЛ-7, отлагающийся на поверхности и влияющий на наивные Т-лимфоциты. Однако отсутствуют данные о количестве ИЛ-7, выделяемом изолированными стромальными клетками *in vitro*. Используемые нами в экспериментах эксплантаты тонзиллярной ткани не секретировали заметного количества цитокина в культуральную среду, поэтому можно предположить, что продуцируемый ИЛ-7 либо остается на поверхности стромальных клеток, либо немедленно поглощается соседними Т-клетками.

Мы обнаружили, что ИЛ-7 значительно усиливал репликацию ВИЧ-1_{BaL} (вариант R5) в цервикагинальных эксплантатах от всех исследованных доноров, включая один образец ткани, в котором без ИЛ-7 в соответствии с нашими критериями (см.

раздел «Материалы и методы») не было вообще обнаружено вирусной репликации. Также мы наблюдали под действием ИЛ-7 усиление репликации ВИЧ-1 в лимфоидной ткани, инфицированной как R5 так и X4 вариантами ВИЧ-1, (лимфоидная ткань, в отличие от цервикагинальной *ex vivo*, поддерживает репликацию обоих фенотипов ВИЧ-1). Такое усиление обнаруживается на 6-й день после инфицирования и, по-видимому, не зависит от абсолютного уровня репликации вируса. Действительно усиление репликации вируса наблюдалось в тканях, инфицированных стократно разведенной вирусной суспензией. Усиление репликации ВИЧ-1 наблюдалось не только на лабораторных штаммах этого вируса, но также на первичных изолятах. Более того, усиление репликации было отмечено у изолятов ВИЧ-1 всех трех протестированных клад. В число этих изолятов входили CCR5-тропные (R5) и CXCR4/CCR5-тропные (X4/R5) варианты ВИЧ-1. Считается, что вирусы первого тропизма преимущественно передаются и преобладают на ранних стадиях развития инфекции, в то время как вирусы последнего тропизма характерны для более поздних стадий заболевания ВИЧ-1 [35, 36]. Таким образом, представляется, что ИЛ-7 является фактором усиления репликации различных вариантов ВИЧ-1 на разных уровнях и в различных тканях человеческого организма.

В целом результаты нашего исследования согласуются с предыдущими сообщениями об усилении под действием ИЛ-7 репликации ВИЧ-1 в стимулированных *in vitro* первичных зрелых тимоцитах [27]

и моноклеарных клетках, изолированных из периферической крови хронически инфицированных пациентов [37]. Кроме того, в предыдущих исследованиях было установлено, что ИЛ-7 делает покоящиеся Т-клетки перmissive для ВИЧ-1 [38], а также может реактивировать латентный ВИЧ-1 в покоящихся CD4⁺ Т-клетках в изолированных из крови инфицированных лиц [39, 40].

Хотя степень активности ВИЧ-1 в наших экспериментах была пропорциональна длительности воздействия ИЛ-7, мы обнаружили, что для активизации ВИЧ-1-инфекции присутствие ИЛ-7 в течение всего периода культивирования необязательно. Действительно, когда ткани подвергались воздействию ИЛ-7 только перед инфицированием ВИЧ-1, последующая репликация ВИЧ-1 также усиливалась.

Так же ИЛ-7 усиливал репликацию ВИЧ-1, когда наносился на эксплантаты в составе семенной жидкости человека. Известно, что эякулированная, коагулированная, разжиженная, замороженная и размороженная, семенная жидкость, является токсичной *in vitro* [20–22]. Поэтому для наших экспериментов мы использовали лимфоидную ткань, в которой репликация ВИЧ-1 носит более выраженный характер, чем в цервикагинальной ткани. Хотя эксперименты по переносу ВИЧ-1 на эксплантаты цервикагинальной ткани с помощью только что эякулированной семенной жидкости ВИЧ-1-инфицированных мужчин дали бы более важные результаты, их проведение сопряжено с логистическими и этическими трудностями. Тем не менее, экстраполяция наших данных на процесс передачи ВИЧ-1 от мужчины к женщине *in vivo* позволяет предположить, что высокая концентрация ИЛ-7 в семенной жидкости может повысить восприимчивость слизистой оболочки нижних половых путей женщины к ВИЧ-1.

Каковы механизмы воздействия ИЛ-7 на инфекцию ВИЧ-1?

Наши данные свидетельствуют о том, что ИЛ-7 предотвращает истощение популяции тканевых CD4⁺ Т-клеток, подавляя их апоптоз. Данные об участии ИЛ-7 в продлении жизни Т-клеток CD4⁺ [14] согласуются с нашими наблюдениями об устойчивом повышении экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в инфицированных и неинфицированных CD4⁺ Т-клетках. Другим доказательством подавления ИЛ-7 апоптоза было сокращение количества CD4⁺ Т-клеток экспрессирующих апоптотический маркер APO2.7. Таким образом, ИЛ-7 не только продлевает жизнь клеток, продуцирующих вирус, тем самым способствуя продолжительному выделению ВИЧ-1, но и предотвращает гибель неинфицированных CD4⁺ Т-клеток, обеспечивая ВИЧ-1 еще большим числом потенциальных целей.

Ослабление апоптоза под действием ИЛ-7, наблюдавшееся в тканях *in vivo*, в целом согласуется с подавлением спонтанного апоптоза в выделенных из крови ВИЧ-1-инфицированных лиц Т-клетках, обработанных *in vitro* ИЛ-7 [41], а также с недавно полученными данными о результатах введения ИЛ-7

макакам резус, находившимся в острой фазе инфекции вирусом иммунодефицита обезьян (ВИО) в отсутствие антиретровирусной терапии [42]. В более позднем исследовании применение ИЛ-7 привело к меньшему истощению популяции циркулирующих CD4⁺ Т-клеток и устойчивому повышению экспрессии Bcl-2 в период репликации ВИЧ.

Однако увеличение числа продуцирующих ВИЧ-1 клеток в тканях, подвергнутых воздействию ИЛ-7, происходит не только из-за подавления апоптоза, но и благодаря тому, что ИЛ-7 стимулировал пролиферацию CD4⁺ Т-клеток, как инфицированных, так и не инфицированных, о чем свидетельствуют наши данные по экспрессии Ki-67. Процесс активизации пролиферации клеток под действием ИЛ-7 был описан для культур изолированных клеток [17, 41, 43–45] и в настоящее время служит основой для клинических испытаний, целью которых является увеличение числа Т-клеток у ВИЧ-1-инфицированных лиц [16, 17].

Нам представляется, что для объяснения наблюдавшейся активизации ВИЧ-1-инфекции под действием ИЛ-7 достаточно двух описанных нами механизмов, а именно предотвращению апоптоза и стимулированию пролиферации CD4⁺ Т-клеток, в результате чего увеличивается число продуцирующих вирус клеток и увеличивается продолжительность их жизни, а следовательно и вирусной продукции. Влиянию ИЛ-7 на инфицирование тканей ВИЧ-1 могут способствовать и другие механизмы. В их число могут входить реакция CD4⁺ Т-клеток на ко-стимулирующие молекулы [37], прямое стимулирование транскрипции длинных концевых повторов ВИЧ-1 [40], повышение экспрессии ко-рецептора CXCR4 на CD4⁺ Т-клетках [45–47] и повышение заражаемости ВИЧ-1 у покоящихся Т-клеток [38].

Хотя система цервикагинальной и лимфоидной тканей *ex vivo* адекватно моделирует основные аспекты заражения ВИЧ-1 *in vivo*, включая размер пула ВИЧ-1-инфицированных Т-клеток CD4⁺, истощение популяции Т-клеток CD4⁺ под действием ВИЧ-1 и пр., она имеет свои ограничения. В частности, в тканях *ex vivo* не происходит циркуляции и пополнения иммунных клеток, которое может играть важную роль в становлении ВИЧ-1-инфекции. Цервикагинальные эксплантаты не окружены эпителиальным слоем, и как ИЛ-7, так и ВИЧ имеют непосредственный доступ к внутренним клеткам слизистой. (Впрочем предполагается, что *in vivo* ВИЧ-1 также имеет доступ к этим клеткам через повреждения эпителиального слоя слизистой оболочки женских половых органов). И, наконец, в нашей модели мы использовали суспензии ВИЧ-1, в то время, как результаты некоторых исследований показывают, ВИЧ-1 может передаваться *in vivo* зараженными клетками [48].

Несмотря на то что мы показали, что ИЛ-7 способствует переносу ВИЧ-1 на цервикагинальную ткань и его распространению в лимфоидной ткани наши результаты не вступают в явное противоречие с благоприятным воздействием ИЛ-7 на

ВИЧ-1-инфицированных лиц [19]. Действительно, согласно результатам исследования Леви и др., подкожное введение ИЛ-7 приводит, в зависимости от дозы, к увеличению числа CD4⁺ Т-клеток у ВИЧ-1-инфицированных пациентов, проходящих антиретровирусное лечение, хотя временная низкая вирусемия ВИЧ наблюдалась у 6 из 26 пациентов [16]. Несмотря на этот положительный эффект, повышенное содержания ИЛ-7 больных, у которых вирус выделяется в сперму, может увеличить вероятность передачи ими ВИЧ-1 своим сексуальным партнерам.

В заключение следует отметить, что хотя данные о влиянии ИЛ-7 на репликацию ВИЧ в изолированных клетках, а также воздействии ИЛ-7 на лиц, уже инфицированных ВИЧ-1, были получены ранее, в нашем исследовании впервые изучена роль ИЛ-7 в передаче ВИЧ-1 от мужчины к женщине. Результаты этого исследования демонстрируют, что воздействие ИЛ-7 на цервикагинальные и лимфоидные ткани *in vivo* в концентрации, сравнимой с его концентрацией в семенной жидкости ВИЧ-1-инфицированных лиц, способствует передаче ВИЧ-1. Активизация продукции ВИЧ-1 под действием ИЛ-7 связана с пролиферацией и подавлением апоптоза инфицированных Т-клеток CD4⁺ и появлении новых клеток-мишеней ВИЧ-1. Результаты этого воздействия могут иметь большое значение для передачи ВИЧ-1, поскольку в шейке матки, в отличие от лимфоидной ткани, содержится сравнительно малое количество CD4⁺ Т-клеток [24], главных мишеней ВИЧ-1 [28]. Поэтому увеличение числа и продление срока жизни ВИЧ-1-инфицированных и неинфицированных клеток приводит к расширению исходного пула инфицированных клеток, что повышает риск заражения ВИЧ-1.

ИЛ-7, судя по всему, принадлежит к группе растворимых факторов [4, 5], способствующих передаче ВИЧ-1. Концентрация таких факторов в семенной жидкости ВИЧ-1-инфицированных мужчин может определять эффективность передачи ВИЧ-1 неинфицированным партнерам во время вагинального полового акта.

Материалы и методы

Культура ткани *ex vivo*

Тонзиллярные ткани от стандартной тонзилэктомии были получены в Детской больнице г. Вашингтон. Цервикагинальные ткани были получены при стандартной гистерэктомии через систему Национального обмена в помощь исследованиям заболеваний (NDRI, Филадельфия, штат Пенсильвания). Все ткани представляли собой анонимные патологические образцы, полученные в соответствии с процедурой, утвержденной Институциональным наблюдательным советом.

Тонзиллярные ткани рассекались на срезы размером приблизительно 8 мм³ и помещались на геле из коллагеновой губки в культуральную среду на поверхности раздела жидкости и воздуха в планшете на 6 лунок (по 9 срезов на лунку, содержа-

щую 3 мл раствора RPMI1640 с добавлением 20% эмбриональной бычьей сыворотки (поставщик – компания Gemini Bioproducts, Вест Сакраменто, штат Калифорния). Для каждой экспериментальной точки использовалось от 18 до 27 срезов в зависимости от характера эксперимента. Срезы ткани инфицировались нанесением на поверхность каждого среза 6,3 мкл вирусного материала, либо не разведенного, либо разведенного 1:100 в растворе RPMI1640 [49]. В некоторых экспериментах инфицирование производилось нанесением вирусного материала, соединенного 20% семенной жидкостью (источник – американский филиал Европейского банка спермы, Сиэтл, штат Вашингтон) в соотношении 1:1.

Слизистый эпителий и подлежащая строма эктоцервикса и эндоцервикса отделяли от мышечной ткани и рассекали на срезы размером приблизительно 8 мм³. Для каждой экспериментальной точки 24 цервикальных среза помещались в две конические пробирки емкостью 1,5 мл (по 12 срезов в пробирку), каждая из которых содержала 0,5 мл вирусного материала ВИЧ-1_{BaL}. После 2-х часов инкубации при температуре 37°C кусочки ткани осторожно промывали три раза с помощью 4 мл физиологического раствора на фосфатном буфере и помещали на гель из коллагеновой губки в планшете на 12 лунок (по 8 срезов на лунку, содержащую 1 мл раствора RPMI1640 с добавлением 20% эмбриональной бычьей сыворотки).

Срезы тонзиллярной и цервикагинальной тканью культивировали в течение 6, 9 и 12 дней (в зависимости от целей эксперимента) в присутствии рекомбинантного цитокина человека ИЛ-7 (поставщик – компания Reprotech, Рокки Хилл, штат Нью-Джерси) в концентрации 5 или 25 нг/мл или без него; среду меняли каждые 3 дня.

Вирусы

Препараты вирусов ВИЧ-1_{BaL} и ВИЧ-1_{LAI.04} были получены из Вирусологической лаборатории контроля качества Университета Раш (Чикаго, штат Иллинойс). Вирусный материал был получен из среды зараженных ВИЧ-1_{BaL} либо ВИЧ-1_{LAI.04} культур моноклеарных клеток периферической крови. Вирусы были изначально получены по Программе предоставления реагентов СПИД, учрежденной Национальными Институтами Здоровья. Концентрации p24 ВИЧ-1 составляли 49 ± 3 нг/мл и 53 ± 3 нг/мл для суспензий ВИЧ-1_{BaL} и ВИЧ-1_{LAI.04} соответственно.

Вирусные материалы клинических штаммов ВИЧ-1 были получены по Программе предоставления реагентов СПИД Национальных институтов здравоохранения; для программы их предоставили доктор Д. Элленбергер, П. Салливан и Р.Б. Лэл (ВИЧ-1_{96USSN20}, ВИЧ-1_{97USNG30} и ВИЧ-1_{96USNG31}) [50], а также доктор Фальгуни Гупта (ВИЧ-1_{ME1}) [51]. Концентрации p24 ВИЧ-1 составляли 182 ± 12 нг/мл, 275 ± 23 нг/мл, 97 ± 6 нг/мл и 914 ± 49 нг/мл для ВИЧ-1_{96USSN20}, ВИЧ-1_{97USNG30}, ВИЧ-1_{96USNG31} и ВИЧ-1_{ME1} соответственно.

Проточная цитометрия

Срезы тонзиллярной и цервикагинальной тканей обрабатывались в течение 30 и 45 минут либеразой с малой концентрацией диспазы (поставщик – компания Roche, Индианаполис, штат Индиана) в конечной концентрации 8 мкг/мл в 1 мл раствора RPMI1640, содержащем дезоксирибонуклеазу I (поставщик – Roche) в конечной концентрации 100 мкг/мл. Суспензии отдельных клеток промывались в окрашивающем буфере, включающем в себя фосфатный физиологический раствор с добавлением 2% нормальной мышиной сыворотки, поставщик – Gemini Bioproducts). Для получения характеристик лимфоцитов суспензии клеток окрашивались моноклональными антителами против CD3 Qdot 655, анти-CD4 Qdot 605 и против CD8 Pacific Blue (поставщик – компания Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) в различных комбинациях. После поверхностного окрашивания клеточные мембраны пермеадиллизировали с помощью раствора Fix & Perm (поставщик – Invitrogen), и клетки окрашивались моноклональными антителами: против следующих антигенов: p24^{gag} ВИЧ-1 меченых флуоресцинизиотиоцианатом (поставщик – компания Beckman Coulter, Фуллертон, штат Калифорния), Bcl-2 меченых фикоэритрином (поставщик – компания BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния) и APO2.7, меченых фикоэритрином Cy5 (поставщик – Beckman Coulter). Вслед за изменением проницаемости мембраны с помощью набора FOXP3 Fix/Perm Buffer (поставщик – компания Biolegend, Сан-Диего, штат Калифорния) клетки окрашивались моноклональным антителом против Ki-67 мечеными фикоэритрином (поставщик – BD Biosciences).

Данные регистрировались на проточном цитометре LSR II (поставщик – BD Biosciences) с линиями излучения лазера величиной 335, 405, 488, 532 и 638 нм, использующим программное обеспечение DIVA 6.1.2 (поставщик – BD Biosciences), и анализировали программой FlowJo, версия 9.4.10 (поставщик – компания Tree Star, Эшленд, штат Орегон). Мы выявили и исключили из анализа мертвые клетки с использованием набора оборудования Blue Dead Cell Stain (поставщик – Invitrogen), и определили область лимфоцитов в соответствии с их светорассеивающими характеристиками. Количественные показатели истощения популяции клеток были получены с использованием счетных бусинок аппаратуры AccuCheck (поставщик – Invitrogen) в соответствии с указаниями производителя.

Динамический иммунофлуоресцентный цитометрический анализ для определения количества p24^{gag} ВИЧ-1

Мы произвели оценку продуктивности ВИЧ-1-инфекции путем измерения количества антигена p24^{gag} ВИЧ-1 в среде культур тонзиллярной и цервикагинальной тканей, используя метод динамического иммунофлуоресцентного цитометрического

гранульного анализа. Анализ производился в соответствии с описанием, приведенным в одной из предыдущих работ [52].

Статистический анализ

Для проведения статистического анализа мы использовали программное обеспечение GraphPad Prism (версия 4.0c). Чтобы учесть вариабельность показателей между донорами, мы рассчитали соотношения между следующими донорскими параметрами (отдельно при воздействии ИЛ-7 и без него): значения концентрации p24^{gag} ВИЧ-1 в культуральных средах, число и процентная доля CD8⁺ p24^{gag} T-клеток, процентные доли APO2.7⁺ T-клеток, Ki-67⁺ T-клеток и значения СИФ для Bcl-2. Для показателей истощения популяции T-клеток CD4⁺ мы рассчитали разницу между процентными долями клеток CD3⁺ CD8⁺ под воздействием ИЛ-7 и без его воздействия. Значения соотношений и разницы были сначала подвергнуты логарифмическому преобразованию для получения нормального распределения, проверенного по критерию нормальности Шапиро–Вилка, а для теста на ненулевое среднее значение использовались одновыборочные *t*-критерии. Все критерии были двусторонними, значение *p* < 0,05 соответствовало статистической значимости.

Номера доступа

В базе данных UniProtKB (адрес вебсайта: <http://www.uniprot.org/>) белки, о которых шла речь в данной статье, имеют следующие номера доступа: BCL2 HUMAN (P10415), IL-7 HUMAN (P13232), KI67 HUMAN (P46013) и p24^{gag} ВИЧ-1 (Q7ZBG8).

Благодарность

Благодаря Программе предоставления исследовательских и референтных реагентов СПИД отдела по борьбе с СПИД Национального института аллергии и инфекционных заболеваний национальных институтов здоровья были получены следующие исходные вещества: ВИЧ-1^{96USSN207}, ВИЧ-1^{97USNG30} и ВИЧ-1^{96USNG31} от докторов Д. Элленбергера, П. Салливэна и Р.Б. Лэла [50] и ВИЧ-1^{ME1} от доктора Фальгуни Гупта [51]. Выражаем признательность докторам Р. Ромеро и С.С. Хассан за великодушно предоставленную помощь в экспериментах с цервикагинальной тканью.

Настоящая работа является частью исследования, проводимого А. Интроини в аспирантуре Миланского университета в сотрудничестве с Национальными институтами здравоохранения по направлению «Молекулярная медицина» на соискание степени доктора наук.

Участие авторов в работе

Разработка и планирование экспериментов: Андреа Интроини, Кристоф Ванпуй, Андреа Лиско, Жан-Шарль Гривель, Леонид Марголис.

Проведение экспериментов: Андреа Интроини, Кристоф Ванпуй.

Анализ данных: Андреа Интроини, Кристоф Ванпуй, Жан-Шарль Гривель, Леонид Марголис.

Написание статьи: Андреа Интроини, Кристоф Ванпуй, Андреа Лиско, Жан-Шарль Гривель, Леонид Марголис.

Финансирование. Данное исследование проводилось при поддержке Внутренней исследовательской программы национальных институтов здоровья. Спонсоры не участвовали в планировании исследования, сборе и анализе данных, принятии решения относительно публикации и подготовке рукописи.

Конкурирующие интересы. Авторы заявили об отсутствии каких бы то ни было конкурирующих интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization (2010) Global Report: UNAIDS Report on the global AIDS epidemic. Available: http://www.unaids.org/globalreport/global_report.htm.
2. Doncel G.F., Joseph T., Thurman A.R. Role of semen in HIV-1 transmission: inhibitor or facilitator? *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011; 65: 292–301.
3. Sabatte J., Lenicov F.R., Cabrini M., Rodriguez C.R., Ostrowski M. et al. The role of semen in sexual transmission of HIV: beyond a carrier for virus particles. *Microbes Infect.* 2011; 13: 977–82.
4. Munch J., Rucker E., Standker L., Adermann K., Goffinet C. et al. Semenderived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell.* 2007; 131: 1059–71.
5. Roan N.R., Muller J.A., Liu H., Chu S., Arnold F. et al. Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection. *Cell Host Microbe.* 2011; 10: 541–50.
6. Martellini J.A., Cole A.L., Venkataraman N., Quinn G.A., Svoboda P. et al. Cationic polypeptides contribute to the anti-HIV-1 activity of human seminal plasma. *FASEB J.* 2009; 23: 3609–18.
7. Politch J.A., Tucker L., Bowman F.P., Anderson D.J. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum. Reprod.* 2007; 22: 2928–35.
8. Berlier W., Cremel M., Hamzeh H., Levy R., Lucht F. et al. Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 1135–42.
9. Kafka J.K., Sheth P.M., Nazli A., Osborne B.J., Kovacs C. et al. Endometrial epithelial cell response to semen from HIV-infected men during different stages of infection is distinct and can drive HIV-1-long terminal repeat. *AIDS.* 2012; 26: 27–36.
10. Li Q., Estes J.D., Schlievert P.M., Duan L., Brosnahan A.J. et al. Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV. transmission. *Nature.* 2009; 458: 1034–8.
11. Ochi D.O., Ochsenbauer C., Kappes J.C., Ghosh M., Fahey J.V. et al. Uterine epithelial cell regulation of DC-SIGN expression inhibits transmitted/founder HIV-1 trans infection by immature dendritic cells. *PLoS One.* 2010; 5: e14306.
12. Anderson J.A., Ping L.H., Dibben O., Jabara C.B., Arney L. et al. HIV-1 populations in semen arise through multiple mechanisms. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1001053.
13. Lisco A., Munawwar A., Introini A., Vanpouille C., Saba E. et al. Semen of HIV-1-infected individuals: local shedding of herpesviruses and reprogrammed cytokine network. *J. Infect. Dis.* 2012; 205: 97–105.
14. Jiang Q., Li W.Q., Aiello F.B., Mazzucchelli R., Asefa B. et al. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16: 513–33.
15. Mackall C.L., Fry T.J., Gress R.E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nature Rev. Immunol.* 2011; 11: 330–42.
16. Levy Y., Sereti I., Tambussi G., Routy J.P., Lelievre J.D. et al. Effects of recombinant human interleukin 7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: Results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 55: 291–300.
17. Sereti I., Dunham R.M., Spritzler J., Aga E., Proschan M.A. et al. IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood.* 2009; 113: 6304–14.
18. Gougeon M.L., Chiodi F. Impact of gamma-chain cytokines on T cell homeostasis in HIV-1 infection: therapeutic implications. *J. Intern. Med.* 2010; 267: 502–14.
19. Sieg S.F. Interleukin-7 Biology in HIV Disease and the Path to Immune Reconstitution. *Curr. HIV Res.* 2012; 10: 341–7.
20. Vernazza P.L., Eron J.J., Fiscus S.A. Sensitive method for the detection of infectious HIV in semen of seropositive individuals. *J. Virol. Meth.* 1996; 56: 33–40.
21. Allen R.D., Roberts T.K. Role of spermine in the cytotoxic effects of seminal plasma. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 1987; 13: 4–8.
22. Okamoto M., Byrn R., Eyre R.C., Mullen T., Church P. et al. Seminal plasma induces programmed cell death in cultured peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* 2002; 18: 797–803.
23. Karlsson I., Grivel J.C., Chen S.S., Karlsson A., Albert J. et al. Differential pathogenesis of primary CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 isolates in ex vivo human lymphoid tissue. *J. Virol.* 2005; 79: 11151–60.
24. Saba E., Grivel J.C., Vanpouille C., Brichacek B., Fitzgerald W. et al. HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal Immunol.* 2010; 3: 280–90.
25. Grivel J.C., Biancotto A., Ito Y., Lima R.G., Margolis L.B. By-stander CD4+ T lymphocytes survive in HIV-infected human lymphoid tissue. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* 2003; 19: 211–6.
26. Grivel J.C., Malkevitch N., Margolis L. Human immunodeficiency virus type 1 induces apoptosis in CD4(+) but not in CD8(+) T cells in ex vivo-infected human lymphoid tissue. *J. Virol.* 2000; 74: 8077–84.
27. Guillemard E., Nugeyre M.T., Chene L., Schmitt N., Jacquemot C. et al. Interleukin-7 and infection itself by human immunodeficiency virus 1 favor virus persistence in mature CD4(+)CD8(2) CD3(+) thymocytes through sustained induction of Bcl-2. *Blood.* 2001; 98: 2166–74.
28. Haase A.T. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature.* 2010; 464: 217–23.
29. Khaled A.R., Durum S.K. Lymphocyte: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nature Rev. Immunol.* 2002; 2: 817–30.
30. Kim K., Lee C.K., Sayers T.J., Muegge K., Durum S.K. The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J. Immunol.* 1998; 160: 5735–41.
31. Sprent J., Surh C.D. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nature Immunol.* 2011; 12: 478–84.
32. Di Carlo E., D'Antuono T., Pompa P., Giuliani R., Rosini S. et al. The lack of epithelial interleukin-7 and BAFF/BLyS gene expression in prostate cancer as a possible mechanism of tumor escape from immunosurveillance. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 2979–87.

33. **Fichorova R.N., Anderson D.J.** Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 508–14.
34. **Zeng M., Southern P.J., Reilly C.S., Beilman G.J., Chipman J.G.** et al. Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naive T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy. *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002437.
35. **Keele B.F., Giorgi E.E., Salazar-Gonzalez J.F., Decker J.M., Pham K.T.** et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 2008; 105: 7552–7.
36. **Regoes R.R., Bonhoeffer S.** The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 269–77.
37. **Smithgall M.D., Wong J.G., Critchett K.E., Haffar O.K.** IL-7 up-regulates HIV-1 replication in naturally infected peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 1996; 156: 2324–30.
38. **Unutmaz D., KewalRamani V.N., Marmon S., Littman D.R.** Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 1735–46.
39. **Bosque A., Famiglietti M., Weyrich A.S., Goulston C., Planelles V.** Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4⁺ T cells. *PLoS Pathog.* 2011; 7: e1002288.
40. **Wang F.X., Xu Y., Sullivan J., Souder E., Argyris E.G.** et al. IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 128–37.
41. **Vassena L., Proschan M., Fauci A.S., Lusso P.** Interleukin 7 reduces the levels of spontaneous apoptosis in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HIV-1-infected individuals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 2355–60.
42. **Vassena L., Miao H., Cimbri R., Malnati M.S., Cassina G.** et al. Treatment with IL-7 prevents the decline of circulating CD4⁺ T cells during the acute phase of SIV infection in rhesus macaques. *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002636.
43. **Armitage R.J., Namen A.E., Sassenfeld H.M., Grabstein K.H.** Regulation of human T cell proliferation by IL-7. *J. Immunol.* 1990; 144: 938–41.
44. **Nugeyre M.T., Monceaux V., Beq S., Cumont M.C., Ho Tsong Fang R.** et al. IL-7 stimulates T cell renewal without increasing viral replication in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Immunol.* 2003; 171: 4447–53.
45. **Steffens C.M., Managlia E.Z., Landay A., Al-Harthi L.** Interleukin-7-treated naive T cells can be productively infected by T-cell-adapted and primary isolates of human immunodeficiency virus 1. *Blood.* 2002; 99: 3310–18.
46. **Llano A., Barretina J., Gutierrez A., Blanco J., Cabrera C.** et al. Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J. Virol.* 2001; 75: 10319–25.
47. **Schmitt N., Chene L., Boutolleau D., Nugeyre M.T., Guillemard E.** et al. Positive regulation of CXCR4 expression and signaling by interleukin-7 in CD4⁺ mature thymocytes correlates with their capacity to favor human immunodeficiency X4 virus replication. *J. Virol.* 2003; 77: 5784–93.
48. **Anderson D.J., Politch J.A., Nadolski A.M., Blaskewicz C.D., Pudney J.** et al. Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention. *AIDS.* 2010; 24: 163–87.
49. **Grivel J.C., Margolis L.** Use of human tissue explants to study human infectious agents. *Nat. Protoc.* 2009; 4: 256–69.
50. **Sullivan P.S., Do A.N., Ellenberger D., Pau C.P., Paul S.** et al. Human immunodeficiency virus (HIV) subtype surveillance of African-born persons at risk for group O and group N HIV infections in the United States. *J. Infect. Dis.* 2000; 181: 463–9.
51. **Chen M., Singh M.K., Balachandran R., Gupta P.** Isolation and characterization of two divergent infectious molecular clones of HIV type 1 longitudinally obtained from a seropositive patient by a progressive amplification procedure. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* 1997; 13: 743–50.
52. **Biancotto A., Brichacek B., Chen S.S., Fitzgerald W., Lisco A.** et al. A highly sensitive and dynamic immunofluorescent cytometric bead assay for the detection of HIV-1 p24. *J. Virol. Meth.* 2009; 157: 98–101.

Поступила 15.03.13