A perifériás vér CD8-pozitív T-sejtjeinek gyakori fertőződése HIV-vel

Cikk: **Livingstone W.J. és mtsai. - Lancet 348, 649, 1997**

A vizsgálat célja az volt, hogy megállapítsák a perifériás vér különböző immun-sejtjei HIV fertőzöttségének mértékét HIV betegekben. Az egyes sejttípusokat standard eljárások segítségével szétválasztották, és mindben PCR módszerrel mérték a HIV-DNS (provirus) mennyiségét.

A vizsgálatot 16 HIV fertőzött egyénben végezték. Először elkülönítették a betegek véréből a mononuclearis sejteket, majd ezt a szuszpenziót monoklonalis ellenanyagokkal borított mágneses gyöngyöket használva öt szubpopulációra (CD4+ T sejtek, CD8+ T sejtek, monocyták, B sejtek és dendritikus sejtek) osztották. A szeparált sejtszubpopulációkból izolálták a DNS-t, és a limitált hígításos nested PCR eljárás útján megmérték a specifikus HIV-1 DNS provirus mennyiséget. Kéttípusú primert (a V3 loopot kódoló env-gén darab, ill. a gag gén egyes részei) alkalmaztak. FACS módszer segítségével megállapították a különböző szubpopulációk arányát a kiindulló mononuclearis sejt-szuszpenzióban, és így azt is ki tudták számítani, hogy a DNS-provirus mennyiség a betegek vérében hogyan oszlott meg az egyes szubpopulációk között.

Eredmények
A mononuclearis sejt-szuszpenziót először két részre osztották a birka vvs-ekkel való rozetta-képzés alapján. A rozetta-képző szubpopulációból különítették el anti-CD4 ellenanyaggal fedett gyöngyök segítségével a CD4+ sejteket, majd a maradékból hasonló eljárás útján a CD8+ sejteket. A rozettát nem képző szubpopulációból először a monocytákat különítették el CD11b és CD14 specifikus monoklonalisokkal bevont mágneses gyöngyök segítségével. A maradék sejtekből izolálták CD14 és CD21 antitestekkel fedett gyöngyöket használva a B sejteket. Az eredeti még megmaradó sejtek többsége dendritikus sejt volt, amelyeket anti-CD4 és anti-HLA-DR ellenanyagokkal bevont gyöngyök segítségével izoláltak.

13 beteg esetében sikerült mind az öt sejt-szubpopulació szeparálása. 8 betegnél a virusgilat előtti időszakban mért CD4+ sejtszám átlagos 200/l-nél kevesebb (1. csoport), míg 5 beteg esetében (2. csoport) ennél magasabb volt. A kapott eredményeket a CD4+ sejtszám, tehát a HIV betegség progresszitja jelentős mértékben befolyásolta. A szeparált CD4+ sejt szubpopulációkban mind a 13 beteg esetében ki lehetett mutatni a HIV-1-DNS-t, ennek mennyisége azonban lényegesen magasabb volt a betegek első csoportjában (39-4882 kópia/106 sejt), mint a másodikban (1-117 kópia/106 sejt). A második csoport betegei vérből szeparált CD8+ sejtszubpopulációban HIV-1-DNS nem (n=4) vagy csak minimális mennyiségben (n=1) volt kimutatható, míg az első csoport minden betegéből elkülöníthető CD8+ sejtek jó mérhető mennyiségben (2-430 kópia/106 sejt) tartalmazták HIV-1 provirus szekvenciákat. A monocyta szuszpenziókban csak négy esetben lehetett HIV-1-DNS-t detektálni, mind a négy pozitív szuszpenzió a HIV betegség előrehaladott stádiumában lévő, igen alacsony CD4+ sejtszámú betegtől származott. Minden egyes B sejt szuszpenzió negatív volt HIV-1-DNS-re. Ezzel ellentétben a szeparált dendritikus sejt szubpopulációk nagy gyakorisággal tartalmazták HIV-1 provirust, 10/13 beteg esetében sikerült ezt detektálni, 6-1099 kópia/106 sejt mennyiségben, itt azonban nem volt olyan nagy különbség a két betegcsoport között, mint a CD4+ vagy a CD8+ T sejtek esetében. Azt is kimutatták, hogy az összes mononuclearis sejtpopulációra számítva, a betegség progresszitjával párhuzamosan arányilag kevesebb CD4+ sejt és több CD8+ sejt a HIV fertőzött.

Mivel a CD8+ sejtek gyakori HIV fertőzöttségét szerzik is meglegő megfigyelésnek találták, egy másik eljárás segítségével is szeparálták a CD8+T sejteket három beteg esetében. Ez az eljárás lehetővé teszi a sejt-szubpopulációk tisztaságának közvetlen meghatározását: a CD8+ sejtek frakciója csak 0,5 - 1,3%-ban tartalmazott CD4+ T sejteket. Mind a három beteg esetében ki tudták mutatni a CD8+ sejtek HIV-1 fertőzöttségét, 8,7-1400 kópia/106 sejt mennyiségben, a két eljárással kapott értékek jó megegyezték egymással, és kizárható volt, hogy ez a CD4+ sejtekkel való minimális mértékű kontaminálódás eredménye lenne.

Megbeszélés
A vizsgálat két legfontosabb eredménye annak az igazolása, hogy a HIV-1 megfertőzi a CD8+ T sejteket az előzőhalálozó HIV betegségben szenvedőkben és betegség korai és késői szakában egyaránt kimutatható a dendritikus sejtek HIV fertőzöttsége is. Korábbi adatok szerint (Schnittman et al., Science 245, 305, 1989; Pallidopoulos et al., J.Virol. 63, 4626, 1989) a CD8+ sejtek nem fertőződnek meg a vírussal in vivo. E korábbi és jelen megfigyelések közötti különbség fő oka valószínűleg az, hogy az 1989-es vizsgálatokban még nekkal kevésbé érzékeny PCR eljárásokat alkalmaztak, amelyekkel a kis mennyiségben jelen lévő vírus nem volt kimutatható.

Különböző magyarázatokat vetnek fel a szerzők a CD8+ sejtek HIV-1-el való fertőződésének mechanizmusára vonatkozóan. (Mivel a CD8+ sejteken CD4 receptor nincs jelen, a CD4-gp120 kölcsönhatással kezdődő magát a CKR-5, ill. CXCR4 koreceptorok közreműködésével folytatódó fertőzési út kizárható).

- A fertőzött CD4+ sejtekkel együtt tenyészetett CD8+ sejtek megfertőződnek a vírussal, így lehetséges, hogy a CD4+ és CD8+ sejtek közötti, fiziológiás immunfolyamatnak tekinthető kölcsönhatás során kerül a HIV-1 a CD8+ sejtekbe.
- A másik lehetőség az, hogy a thymusban a T sejtek egy olyan első-alakja fertőződik meg a vírussal, amely még a CD4 és CD8 receptort együtt hordozza, majd e HIV fertőzött sejtekből differenciálódnának a HIV-1-et hordozó CD8+ T sejtek.
- Egy harmadik lehetőség az, hogy a CD8+ sejteket a HIV egy, a CD4-től független mechanizmus útján fertőzi meg. E folyamathan szerepet játszhatnak a CKR-5 koreceptorok is, melyek a legújabb adatok szerint jelen vannak a CD8+ sejteken is. - Ezek az eredmények valószínűvé teszik azt a lehetőséget, hogy a CD8+ sejtek számának a HIV betegség végső stádiumában észlelhető csökkenése a vírus közvetlen cytopathogén hatásának tulajdonítható.

A dendritikus sejtek HIV-fertőzöttségére vonatkozó korábbi irodalmi adatok ellentmondóak: egyes szerzők ki tudták mutatni, mások nem tudták detektálni a vírust a betegek véréből vagy a nyirokcsomóból szeparált dendritikus sejtekben. Jelen cikk szerzői a vizsgált betegek többségében (10/13) ki tudták mutatni a HIV-1 provirust a szeparált dendritikus sejtszubpopulációkban. Azt is igazolták, hogy az e sejtekben jelen lévő vírus V3 kacsának szekvenciája különbözik az ugyanennek a betegnek a CD4+ vagy CD8+ sejtjeiben megtalálható törzsek V3 szekvenciáitól, amely egyértelműen bizonyítja, hogy e sejtek in vivo valóban megfertőződtek a vírussal.

Szerzők eredményei arra mutatnak, hogy a HIV-1 sejttropizmusa sokkal szélesebb, mint ezt eddig gondolták. E megfigyelések igen lényegesek lehetnek a HIV betegség pathomechanizmusának megértése és az új terápiás stratégiák kidolgozása szempontjából.