

УКОРОЧЕНИЕ ТЕЛОМЕР В ЛИМФОЦИТАХ CD4⁺ И CD8⁺ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ АССОЦИИРОВАНО С ИЗМЕНЕНИЕМ ИХ КОЛИЧЕСТВА И СООТНОШЕНИЯ

Вячеслав Игоревич БОРИСОВ, Владимир Сергеевич КОЖЕВНИКОВ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

В данной работе исследовалась длина теломер и уровень активации лейкоцитов у ВИЧ-инфицированных больных. Было обнаружено, что у пациентов с ВИЧ-инфекцией теломеры были более короткие в популяциях лимфоцитов (на 0,8 тыс. пар нуклеотидов, *p* < 0,05) и моноцитов (на 0,35 тыс. п. н., *p* > 0,05). Также в обеих популяциях достоверно выше процент пролиферирующих клеток и клеток в апоптозе. Выделив из всей популяции лимфоцитов клетки CD4⁺ и CD8⁺, выявили значительное укорочение теломер в обеих субпопуляциях (на 1,1 и 0,9 тыс. п. н. соответственно, *p* < 0,01). Количество клеток в апоптозе и фазе S/M клеточного цикла было выше у пациентов с ВИЧ только в субпопуляции CD4⁺ без достоверных различий для лимфоцитов CD8⁺. Соотношение количества лимфоцитов CD4⁺ к CD8⁺ у больных ВИЧ составило $0,72 \pm 0,491$. Снижение количества лимфоцитов CD4⁺ приводит к развитию лимфопении, и поддержание общего лимфоцитоза происходит за счет усиления пролиферации лимфоцитов CD8⁺, причем у некоторых пациентов их количество превышало нормальное значение. Такая массивная пролиферация вместе с хронической антигенной активацией приводит к резкому укорочению теломер. Это подтверждается обратной зависимостью длины теломер лимфоцитов CD8⁺ от количества клеток: чем их больше, тем короче в них теломеры. Для лимфоцитов CD4⁺ соотношение было прямым: укорочение теломер происходит тогда, когда происходит снижение их количества. Уровень лимфоцитов CD4⁺ начинает заметно снижаться при истощении компенсаторных механизмов, направленных на поддержание постоянного количества, результатом которого является накопление клеток CD4⁺ с короткими теломерами. В итоге происходит быстрое пролиферативное старение обеих субпопуляций и еще большее истощение иммунной системы.

Ключевые слова: теломеры, ВИЧ, CD4⁺, CD8⁺, апоптоз.

Основным признаком развития синдрома приобретенного иммунодефицита в результате заражения вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) 1 типа является снижение количества Т-лимфоцитов CD4⁺ в периферической крови. Лечение может приводить к увеличению уровня клеток CD4⁺, но их репертуар так и не восстанавливается, поэтому у таких пациентов остается высокий риск развития оппортунистических инфекций [1]. Во время первичной инфекции иммунная система реагирует в направлении предотвращения распространения вируса, с основой в ВИЧ-специфическом CD8⁺-Т-клеточном ответе, что приводит к снижению виремии [2]. В дополнение к усиленному Т-клеточному обновлению и увеличению пропорции высокодифференцированных антигенспецифичных лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ при ВИЧ-инфекции инфицированные больные характеризуются сниженной продукцией наивных Т-клеток, что отражает ослабление способности возобновления пула Т-лимфоцитов [3].

Среди факторов, которые могут влиять на репликативный потенциал и клональное истощение, значительная роль отводится феномену укорочения ДНК во время репликации клетки [4]. Поскольку каждое удвоение ДНК сопровождается концевой недорепликацией дочерней нити, она становится короче на несколько десятков нуклео-

тидов, и такое укорочение происходит за счет потери бессмысленных теломерных повторов. Теломерная ДНК является терминальной последовательностью на концах линейных хромосом и состоит из повторяющихся tandemно расположенных гексаповторов TTAGGG [5]. Функция теломер заключается в предотвращении повреждения жизненно важных генов, и когда теломеры достигают некоторой критической длины, происходит запуск процесса клеточного старения и остановки деления. Таким образом, укорочение теломер может способствовать ограничению репликативной жизни нормальных соматических клеток. Поэтому при хронической активации иммунной системы антигенами, присутствующими в организме, происходит ее функциональное истощение и снижение пролиферативного потенциала, что проявляется увеличенной предрасположенностью к инфекциям и плохим прогнозом у ВИЧ-инфицированных больных [6]. К лабораторным и клиническим проявлениям этой активации относятся высокий уровень спонтанной пролиферации лимфоцитов *in vitro*, экспрессия маркеров активации на лимфоцитах CD4⁺ и CD8⁺ и усиление выработки провоспалительных цитокинов.

Помимо увеличения пролиферации, активация лимфоцитов может приводить к истощению

Борисов В.И. — к.б.н., н.с. лаборатории клинической иммунопатологии, e-mail: borisovslava@yandex.ru
Кожевников В.С. — д.м.н., проф., зав. лабораторией клинической иммунопатологии, e-mail: kvs@ngs.ru

их пула, поскольку служит одним из пусковых факторов апоптоза. При ВИЧ-инфекции апоптоз служит одной из причин массовой гибели лимфоцитов, при этом доля клеток, подвергающихся апоптозу, зависит не от числа зараженных лимфоцитов или стадии ВИЧ-инфекции, а от числа активированных лимфоцитов [7, 8].

К настоящему времени многочисленные исследования динамики длины теломер в лимфоцитах у ВИЧ-инфицированных людей до сих пор не показывают однозначных результатов. В одной из ранних работ было обнаружено, что длина теломер в Т-лимфоцитах CD4⁺ у ВИЧ-позитивных больных была значительно больше, чем у здоровых доноров, но в клетках CD8⁺ оказалась короче [9]. Позднее показали, что ускоренное укорочение теломер происходит в обеих субпопуляциях лимфоцитов, CD4⁺ и CD8⁺, причем степень сокращения обратно коррелирует с количеством клеток: чем меньше становилось лимфоцитов, тем более короткие были в них теломеры [10]. В одной из недавних работ было установлено, что количество лимфоцитов CD4⁺ снижалось как в группе ВИЧ-инфицированных пациентов без проявления симптомов заболевания, так и у людей с симптоматическим проявлением синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) с еще большим укорочением теломер. Однако количество клеток CD8⁺, наоборот, увеличивалось в обеих группах [2].

Возможно, такое увеличение происходит не только для усиления процесса элиминации вируса, но и как компенсаторный механизм Т-клеточного гомеостаза для поддержания общего лимфоцитоза. Поэтому целью данного исследования было определение степени репликативного старения, уровня активации и апоптоза в субпопуляциях Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺, а также признаков гомеостатических процессов у ВИЧ-инфицированных больных.

Материал и методы

Группа больных ВИЧ-инфекцией была сформирована из пациентов, направленных на обследование в НИИ клинической иммунологии СО РАМН г. Новосибирска из Центра профилактики и борьбы со СПИДом, г. Новосибирск (n = 31, средний возраст 28 ± 6,6 лет). Группа контроля была сформирована из здоровых доноров (n = 32, средний возраст 28 ± 6,8 лет). Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000 г.).

Измерение длины теломер с помощью метода Flow-FISH

Определение длины теломер проводили методом гибридизации *in situ*, с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. Лейкоциты, отмытые забуференным физиологическим раствором с 0,1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) («Sigma», США) (ЗФР-БСА), метили мышьяковыми биотинилированными анти-CD4 или анти-CD8 антителами

(«Becton Dickinson», США). Инкубировали 20 минут при 37 °С, отмывали ЗФР-БСА, добавляли стрептавидин с флуорохромом Cy5 и инкубировали еще 20 минут. После отмывки вводили 4 мМ раствора BS³ (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat, «Pierce», США), через 30 минут добавляли Tris («Sigma», США) в конечной концентрации 20 мМ, инкубировали 15 минут и отмывали ЗФР-БСА. Затем смешивали со спленоцитами мышей линии C57BL/6 (питомник «Рассвет», г. Томск) и осаждали. Осадок ресуспендировали в 300 мкл гибридационного раствора, состоящего из 70%-ного формамида («Sigma», США), 20 мМ Tris и 1 % БСА. Зонд (CCCTAA)₃-FITC («EUROGENTEC Ltd», Бельгия), добавляли в концентрации 0,3 мкг/мл. Пробы нагревали 10 минут при 80 °С и гибридизовали 3 часа при +20 °С. Затем клетки переносили в пробирки для цитометрии, дважды отмывали раствором 70%-го формамида и однократно ЗФР-БСА + 0,1 % Tween. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл ЗФР-БСА, содержащим 25 мкл/мл РНКазы и 2 мкл/мл 7-аминоактиномицина D (ICN «Biomedicals Inc.», США). Анализ проб проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) с помощью программного обеспечения «Cell Quest^{PRO}» («Becton Dickinson», США). Сигнал флуоресценции теломер исследуемых клеток определяли как средний уровень флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) клеток, находящихся в фазе клеточного цикла G₀/G₁, вычитанием фоновой аутофлуоресценции (т. е. MFI контрольных образцов, прошедших FISH в отсутствие PNA-зонда). Относительные значения длины теломер определяли как отношение MFI исследуемого образца к MFI спленоцитов мыши. Дополнительно вводили коэффициент для уравнивания сигнала на количество хромосом между клетками человека и мыши.

После пересчитывали абсолютную длину теломер через относительную по формуле $Y = 2042 + 28\,099 \times X$, где Y – средняя длина теломер на популяцию клеток в парах нуклеотидов, X – уровень сигнала по каналу светимости зонда относительно сигнала от клеток внутреннего контроля. Эта формула прямой была получена путем построения зависимости средней длины теломер в лейкоцитах у 5 доноров, измеренной с помощью Southern Blotting и уровня флуоресценции этих же клеток, относительно флуоресценции контрольных клеток.

Метод определения уровня апоптоза и спонтанной пролиферации

Относительное содержание клеток с гипердиплоидным (клетки в фазе клеточного цикла S/M) и с гиподиплоидным (клетки в апоптозе) набором ДНК определяли по степени флуоресценции внутриядерного красителя на проточном цитофлуориметре. Результаты выражали в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству лимфоцитов (моноцитов) в исследуемой области.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов проводилась в программе «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», США). Использовались методы описательной и непараметрической статистики (U-тест Манна – Уитни). Все данные представлены в формате «среднее значение \pm стандартная ошибка».

Результаты**Определение длины теломер**

На первом этапе исследования были определены длины теломер в основных популяциях лейкоцитов периферической крови у группы доноров и больных ВИЧ-инфекцией. Оказалось, что значительная разница в сторону укорочения присутствует у ВИЧ-инфицированных пациентов только в лимфоцитах, с незначительным укорочением в моноцитах (табл. 1). В гранулоцитах пациентов исследуемых групп средняя длина теломер была идентична. У здоровых доноров наибольшая средняя длина теломер среди всех лейкоцитов была обнаружена в лимфоцитах, тогда как у пациентов с ВИЧ-инфекцией показатели были инвертированы: в гранулоцитах длина теломер была наибольшая, а в лимфоцитах, наоборот, наименьшая.

Уровень апоптоза и спонтанной пролиферации был исследован для популяций лейкоцитов периферической крови с более короткими теломерами у ВИЧ-инфицированных больных (лимфоцитов и моноцитов). Оказалось, что при ВИЧ-инфекции количество клеток в апоптозе и в фазе S/M клеточного цикла достоверно превосходит соответствующие показатели у доноров в обеих популяциях ($p < 0,01$). Количество лимфоцитов доноров в апоптозе и в S/M-фазе клеточного цикла составило $0,600 \pm 0,095$ и $0,150 \pm 0,023$ % соответственно, моноцитов – $1,480 \pm 0,234$ и $0,230 \pm 0,036$ %. У ВИЧ-пациентов количество лимфоцитов в апоптозе было $1,360 \pm 0,272$ %, в S/M-фазе – $0,790 \pm 0,158$ %, моноцитов – $2,420 \pm 0,484$ и $1,160 \pm 0,232$ % соответственно.

Средняя длина теломер общей популяции лимфоцитов будет только косвенно отражать измене-

Таблица 2

Длина теломер (тыс. п. н.)
в субпопуляциях лимфоцитов пациентов
с ВИЧ-инфекцией и здоровых доноров

	Доноры, n = 26	ВИЧ-инфицированные пациенты, n = 19
Лимфоциты CD4 ⁺	$8,5 \pm 0,29$	$6,91 \pm 0,23^{**}$
Лимфоциты CD8 ⁺	$8,1 \pm 0,23$	$6,67 \pm 0,26^{**}$
Возраст, лет	$27 \pm 6,5$	$27 \pm 4,3$

Примечание: ** – отличие от соответствующего значения у доноров достоверно при $p < 0,01$.

ние длины теломер в субпопуляциях хелперных (CD4⁺) и цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺), которые принимают основное участие при ВИЧ-инфекции, поэтому была исследована длина теломер отдельно в клетках CD4⁺ и в CD8⁺. Оказалось, что у ВИЧ-инфицированных больных теломеры резко укорочены в обеих субпопуляциях лимфоцитов и соответствуют биологическому возрасту на 18 лет старше (табл. 2).

Количество клеток в апоптозе и в фазе S/M у ВИЧ-инфицированных больных было больше только в субпопуляции клеток CD4⁺, составив соответственно $1,01 \pm 0,317$ и $1,090 \pm 1,049$ % (у доноров – $0,47 \pm 0,251$ и $0,510 \pm 0,669$ %, $p < 0,05$). Для популяции лимфоцитов CD8⁺ не было найдено достоверных различий между донорами и больными с ВИЧ-инфекцией. У всех исследуемых пациентов с ВИЧ наблюдалось резкое снижение соотношения количества CD4⁺/CD8⁺ в периферической крови, составившего в среднем $0,72 \pm 0,491$. Такое уменьшение индекса может происходить как за счет снижения числа клеток CD4⁺ в результате вирусного повреждения и активационного апоптоза, так и за счет повышения содержания лимфоцитов CD8⁺ за счет антигенной и гомеостатической пролиферации. Присутствует обратная зависимость между количеством клеток в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺: чем больше одних, тем меньше других ($p < 0,05$), и наоборот.

Поскольку пролиферативную историю прямо отражает длина теломер, был построен график зависимости длины теломер от количества клеток CD4⁺ и CD8⁺ у ВИЧ-инфицированных больных, представленный на рисунке. Выявлена четкая корреляция между длиной теломер и количеством лимфоцитов. При этом для клеток CD4⁺ корреляция была положительная, т. е. чем клеток меньше, тем короче в них теломеры, а для лимфоцитов CD8⁺ – отрицательная, т. е. при увеличении их количества происходит укорочение теломер у ВИЧ-инфицированных больных. В группе доно-

Таблица 1

Длина теломер (тыс. п. н.)
в популяциях лейкоцитов пациентов
с ВИЧ-инфекцией и здоровых доноров

	Доноры, n = 32	ВИЧ-инфицированные пациенты, n = 31
Лимфоциты	$7,3 \pm 0,29$	$6,5 \pm 0,19^*$
Моноциты	$7,1 \pm 0,21$	$6,8 \pm 0,23$
Гранулоциты	$6,8 \pm 0,27$	$6,9 \pm 0,39$
Возраст, лет	$28 \pm 6,8$	$28 \pm 6,6$

Примечание: * – отличие от соответствующего значения у доноров достоверно при $p < 0,05$.

ров корреляции между количеством субпопуляций лимфоцитов и длиной теломер не были выявлены.

Обсуждение

Поскольку хроническая активация иммунной системы из-за длительной персистенции вируса при ВИЧ-инфекции затрагивает все клеточные элементы, была исследована длина теломер в основных популяциях лейкоцитов периферической крови. Оказалось, что укорочение теломер происходит не только в лимфоцитах, как это было показано ранее при многих исследованиях [6, 9, 10], но и в моноцитах. Такое укорочение не является достоверно значимым, тем не менее оно указывает на активацию и пролиферативную историю моноцитарно-макрофагального звена иммунной системы. Подтверждением этому служит факт выявления большего количества у ВИЧ-инфицированных больных как лимфоцитов, так и моноцитов в фазе S/M клеточного цикла. Повышенный процент клеток в апоптозе может быть результатом как прямого цитопатического действия вируса, так и «активационного» апоптоза из-за хронической активации лейкоцитов антигенами [11, 12].

Одними из основных клеточных элементов, затрагиваемых и участвующих в иммунном ответе при ВИЧ-инфекции, являются лимфоциты CD4⁺ и CD8⁺. Измерение длины теломер выявило их значительное укорочение, в одинаковой степени выраженное в обеих субпопуляциях у больных ВИЧ-инфекцией, что говорит об одинаковой пролиферативной истории субпопуляций. В то же время количество пролиферирующих клеток было больше, чем у доноров, только в субпопуляции CD4⁺, но у этих клеток был повышен и уровень апоптоза. В субпопуляции CD8⁺ не было значительных различий с донорами.

Иммунная система устроена таким образом, что поддерживает на постоянном уровне количество своих клеточных элементов [13, 14]. При снижении числа лимфоцитов CD4⁺ необходимо восстановление их должного уровня, но т. к. при ВИЧ-инфекции тимопоз резко истощается [3], то запускается универсальный ответ на лимфопению — гомеостатическая пролиферация, в которую входят только клетки памяти, уже прошедшие антигенную презентацию и имеющие укороченные теломеры. Пролiferация CD8⁺-лимфоцитов вызывается их активацией как цитотоксических лимфоцитов для снижения вирусемии [9], однако помимо этого также происходит запуск гомеостатической пролиферации. Падение количества клеток CD4⁺ приводит к снижению общего количества лимфоцитов, которое может восстанавливаться за счет субпопуляции CD8⁺-клеток. На ранних стадиях СПИД еще нет выраженной лимфопении, однако отношение лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺ отличается на порядок, и чем ниже количество первых, тем выше содержание вторых, причем практически у всех пациентов количество CD8⁺ превышало нормальное значение.

Эти лимфоциты начинают заполнять освободившуюся от CD4⁺-клеток нишу [14].

Последствия этих процессов отражены на рисунке. Видно, что теломеры в клетках CD4⁺ укорачиваются при снижении их количества, тогда как укорочение теломер в клетках CD8⁺ происходит, наоборот, при увеличении их количества. Оказалось, что чем ниже соотношение CD4⁺/CD8⁺, тем достоверно короче теломеры в CD4⁺-лимфоцитах ($p < 0,05$), т. е. присутствует прямая связь между тяжестью поражения иммунной системы и степенью укорочения теломер в лимфоцитах. Предполагается, что при падении уровня CD4⁺, когда это указывает на серьезное поражение иммунной системы, все компенсаторные механизмы для поддержания количества лимфоцитов были запущены, что приводит к резкому укорочению теломер. Одновременно со снижением числа лимфоцитов CD4⁺ возрастает количество клеток CD8⁺ за счет гомеостатической пролиферации, что также приводит к резкому укорочению теломер последних. Напротив, при незначительном снижении уровня клеток CD4⁺ нет массивной пролиферации, не запускается гомеостатическая пролиферация CD8⁺ лимфоцитов, и не происходит быстрого укорочения теломер в обеих субпопуляциях. Причем, так как не нарушен тимопоз, восстановление количества CD4⁺ идет за счет притока новых клеток с длинными теломерами, поэтому возможно удлинение теломер в среднем в популяции у ВИЧ-инфицированных доноров [9].

Быстрое укорочение теломер приводит к резкому уменьшению пролиферативного потенциала лимфоцитов, невозможности элиминации чужеродных антигенов и увеличению предрасположенности к инфекциям. Таким образом, длина теломер в субпопуляциях лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ является не только показателем репликативного старения, но и совместно с их количеством дополнительным показателем уровня повреждения иммунной системы и косвенным маркером степени истощения компенсаторных гомеостатических процессов.

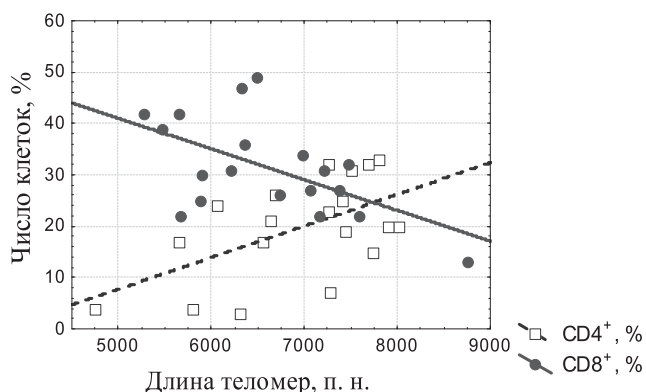


Рис. Зависимость длины теломер лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ от количества клеток у больных ВИЧ-инфекцией, $n = 19$. CD4⁺: $r = 0,57$, $p < 0,05$; CD8⁺: $r = -0,57$, $p < 0,05$.

Список литературы

1. Connors M., Kovacs J.A., Krevat S. et al. HIV infection induces changes in CD4⁺ T-cell phenotype and depletions within the CD4⁺ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies // Nat. Med. 1997. 3. (5). 533–540.
2. Singh H.R., Singh N.G.B., Singh T.B. Estimation of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome patients in Manipur // Indian J. Med. Microbiol. 2007. 25. (2). 126–132.
3. Richardson M.W., Sverstiuk A., Hendel H. et al. Analysis of telomere length and thymic output in fast and slow/non-progressors with HIV infection // Biomed. Pharmacother. 54. (1). 2000. 21–31.
4. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // J. Theor. Biol. 1973. 41. (1). 181–190.
5. Blackburn E.H. Structure and function of telomeres // Nature. 1991. 350. 569 – 573.
6. Papagno L., Spina C.A., Marchant A. et al. Immune activation and CD8⁺ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 Infection // PLoS Biol. 2004. 2. (2). 173–185.
7. Meyaard L., Otto S.A., Jonker R.R. et al. Programmed death of T cells in HIV-1 infection // Science. 1992. 257. 217–219.
8. Banda N.K., Bernier J., Kurahara S.D.K. et al. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis // J. Exp. Med. 1992. 176. 1099–1106.
9. Palmer L.D., Weng N., Levine B.L. et al. Telomere length, telomerase activity, and replicative potential in HIV infection: Analysis of CD4 and CD8 T-cells from HIV-discordant monozygotic twins // J. Exp. Med. 1997. 185. 1381–1386.
10. Bestilny L.J., Gill M.J., Mody C.H., Ryabowol K.T. Accelerated replicative senescence of the peripheral immune system induced by HIV infection // AIDS. 2000. 14. 771–780.
11. Stan G.-B., Belmudes F., Fonteneau R. et al. Modelling the influence of activation-induced apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells on the immune system response of a HIV-infected patient // Syst. Biol. 2008. 2. 94–102.
12. Varadhachary A.S., Perdow S.N., Hu C. et al. Differential ability of T-cell subsets to undergo activation-induced cell death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997. 94. 5778–5783.
13. Tanchot C., Rosado M.M., Agenes F. et al. Lymphocyte homeostasis // Semin. Immunol. 1997. 9. 331–337.
14. Mahajan V.S., Leskov I.B., Chen J. Homeostasis of T cell diversity // Cell. Mol. Immunol. 2005. 2. 1–10.

TELOMERE SHORTENING IN BOTH CD4⁺ AND CD8⁺ CELLS FROM HIV PATIENTS IS ASSOCIATED WITH CHANGES OF THEIR NUMBERS AND RATIO

Vyacheslav Igorevich BORISOV, Vladimir Sergeevich KOZSHEVNIKOV

*Institute of Clinical Immunology SB RAMS
630099, Novosibirsk, Yadrintsevskaya st., 14*

In present work the telomere length and activation level of leucocytes from HIV-patients was measured. It was found that telomeres were shorter in lymphocytes (on 0,8 kbp, $p < 0,05$) and monocytes (on 0,35 kbp, $p > 0,05$) from HIV-patients. The number of proliferate and apoptotic cells in analyzed populations were greater in HIV-patients also. When both CD4⁺ and CD8⁺ subsets were separated it was detected significant telomere shortening in these subpopulations from HIV-patients comparing with donors (on 1,1 and 0,9 kbp, respectively, $p < 0,01$). The amount of apoptotic cells and cells in S/M phase was higher in HIV-patients in CD4⁺ subset whereas there were not any differences between donors and HIV-patients in CD8⁺ leucocytes. The rate of CD4⁺ to CD8⁺ amount was $0,72 \pm 0,491$ in patients with HIV infection. Decreased CD4⁺ level leads to lymphopenia and the maintenance of lymphocytosis is kept up by CD8⁺ lymphocytes proliferation, and many patients contained extremely high level of CD8⁺ cells even more than in donors. So expressed proliferation simultaneously with chronicle antigen activation results in telomere shortening. It is confirmed by inverse relation of CD8⁺ telomere length from cell number: the more CD8⁺ amount the shorter telomeres. In CD4⁺ lymphocytes the relationship was direct: the telomere shortening takes place when the number of CD4⁺ decreases. The amount of CD4⁺ lymphocytes decreases appreciably when the compensatory mechanisms necessary to support the constant lymphocyte amount are depleted. The result of that is an accumulation of CD4⁺ cells with short telomeres. The outcome of that is fast proliferative aging of both subsets as well as hard immune depletion.

Key words: telomere, HIV, CD4⁺, CD8⁺, apoptosis.

Borisov V.I. — candidate of biological sciences, laboratory of clinical immunopathology,
e-mail: borisovslava@yandex.ru

Kozhevnikov V.S. — doctor of medical sciences, professor, the head of laboratory of clinical immunopathology,
e-mail: kvs@ngs.ru