

# EVALUAREA EXPRESIEI CD28 ÎN INFECȚIA HIV – UN MODEL DE ÎMBĂTRÂNIRE ACCELERATĂ

## *Evaluation of CD28 expression in HIV infection – a model of accelerated aging*

Dr. Iuliana Apostol de Jong<sup>1</sup>, Dr. Simona Erșcoiu<sup>2,3</sup>, Dr. GrațIELA Târdei<sup>3</sup>,  
Dr. Maria Nica<sup>2,3</sup>, Dr. Dan Constantin Duiculescu<sup>3</sup>, Dr. Emanoil Ceaușu<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Centrul de Diagnostic și Tratament „Dr. Victor Babeș”, București

<sup>2</sup>Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

<sup>3</sup>Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. Victor Babeș”, București

### REZUMAT

**Introducere.** Infecția HIV determină modificări în sistemul imun adaptativ și o inflamație cronică, modificări similare cu cele din imunosenescență. O variație semnificativă a subseturilor de limfocite din sângele periferic a fost raportată la indivizii sănătoși din diferite regiuni geografice, ca și în infecția HIV și în îmbătrânire. Sunt necesare referințe naționale pentru toate grupele de vârstă, care să includă și subiecții vârstnici. În acest studiu ne-am propus să comparăm subseturile de limfocite din sângele periferic și expresia CD28, ca un marker de îmbătrânire, la subiecți tineri și vârstnici infectați HIV și la subiecți control potriviți ca vârstă, pentru prima dată în România.

**Material și metodă.** Am efectuat un studiu transversal, de tip caz-control, în București, pe un număr de 38 de subiecți infectați HIV, tratați cu terapie antiretrovirală și 26 de subiecți control, HIV seronegativi, sănătoși, potriviți ca vârstă. Fiecare subiect a fost evaluat pentru următorii parametri: număr total de limfocite, celule T (total, CD4, CD8), B, NK în valoare absolută și procent, CD4/CD8 și subseturile CD8/CD28.

**Rezultate.** Măsurarea parametrilor TCD4, TCD8 și raportul CD4/CD8 a condus la diferențe semnificative statistic la subiecții HIV+ comparativ cu subiecții control, datorate infecției HIV. TCD4 în valoare procentuală și absolută a avut valori mai mici în lotul pacienților HIV+ comparativ cu subiecții control (media 21,3% vs. 46,9%,  $p < 0,001$  și 436 vs. 908 cel/μL,  $p < 0,001$ , respectiv). TCD8 în valoare procentuală și absolută a avut valori mai mari la subiecții HIV+ comparativ cu subiecții control (media 919 vs. 446 cel/μL,  $p < 0,001$  și 45,9% vs. 21,9%,  $p < 0,001$ , respectiv). Analiza CD8 și exprimarea antigenului CD28 pe limfocite a relevat o valoare semnificativ mai mare a parametrului CD8 + CD28+ la subiecții HIV+ în valoare procentuală și absolută (media 18,4% și 363 cel/μL) comparativ cu subiecții control (10,8% și 273 cel/μL,  $p < 0,001$  pentru ambele valori). Această diferență poate fi cel puțin parțial dată de infecția HIV, întrucât populația limfocitară TCD8 se extinde cu progresia bolii. Diferențele legate de vârstă au fost semnificative doar la subiecții control, în special privind CD28. Singurul marker independent modificat într-un mod similar în infecția HIV și îmbătrânire a fost procentul de CD28+ din limfocitele CD8+, care a fost semnificativ mai scăzut la subiecții HIV comparativ cu subiecții control (media 41,9% vs. 55,6%,  $p = 0,0007$ ) și la subiecții vârstnici control comparativ cu tinerii control (46,5% vs. 63,2%,  $p = 0,0043$ ).

**Concluzii.** Evaluarea expresiei CD28 la nivelul limfocitelor periferice CD8+ poate fi un marker util de imunosenescență, atât la subiecții sănătoși, cât și la subiecții infectați HIV. Limfocitele care exprimă CD28+ sunt găsite mai puțin frecvent la pacienții HIV indiferent de vârstă și la subiecții vârstnici control. Corelațiile clinice ale acestui biomarker ar trebui studiate în continuare, în vederea validării parametrului CD28, ca un biomarker util în evaluarea imunosenescenței.

**Cuvinte cheie:** HIV, imunosenescență, limfocite T, B, NK, CD28, intervale de referință, imunofenotipare

Adresă de corespondență:

Dr. Iuliana Apostol de Jong, Centrul de Diagnostic și Tratament „Dr. Victor Babeș”, București

## ABSTRACT

**Introduction.** HIV infection determines adaptive immune response alterations and chronic inflammation, a process very similar to immunosenescence. Significant variation of peripheral blood lymphocyte subsets is reported for healthy individuals from different geographical regions, as well as during HIV infection and aging. National references for all age groups, including elderly subjects, are thus required. In this study we aimed to compare peripheral blood lymphocyte subsets and the expression of CD28, as an aging marker, in Romanian HIV infected young to elderly adults and age-matched healthy controls.

**Material and methods.** We have performed a cross-sectional study, case-control, with 38 HIV infected, antiretroviral treated patients and 26 HIV seronegative, age-matched healthy controls, in Bucharest, Romania. Each subject has been evaluated for the following parameters: total lymphocyte counts, T (total, CD4, CD8) B, NK, lymphocyte count and percentage, CD4/CD8 ratio, and CD8/CD28 lymphocyte subsets.

**Results.** The measurements of TCD4, TCD8, and CD4/CD8 ratio gave significantly different results in HIV infected patients compared to controls, due to HIV infection. TCD4 percentages and counts were lower in HIV infected patients compared to controls (averages of 21.3% vs. 46.9%,  $p < 0.001$  and 436 vs. 908 cell/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0.001$ , respectively). TCD8 percentages and counts were higher in HIV infected patients compared to controls (averages of 45.9% vs. 21.9%,  $p < 0.001$  and 919 vs. 446 cell/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0.001$ , respectively). Analysis of CD8 and CD28 expression on lymphocytes revealed a significantly higher CD8 + CD28+ in HIV patients in percent and count (averages of 18.4% and 363 cells/ $\mu\text{L}$ ) compared to controls (averages of 10.8% and 273 cells/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0.001$  for both). This difference can be at least partially due to HIV infection, as TCD8 lymphocyte populations expand with disease progression. Age related differences were significant only in the healthy controls, especially regarding CD28. The only independent marker modified in similar way by HIV infection and aging was the percentage of CD28 positive cells among CD8 positive lymphocytes, i.e. it was significantly lower in HIV patients compared to controls (average of 41.9% vs. 55.6%,  $p = 0.0007$ ) and in older controls compared to younger controls (46.5% vs. 63.2%,  $p = 0.0043$ ).

**Conclusions.** The assessment of CD28 expression in conjunction with CD8 on peripheral blood lymphocytes can be a useful immunosenescence marker for healthy and HIV infected patients. CD28 positive lymphocytes were found less frequently in HIV infected patients irrespective of age, and in older healthy controls. Clinical correlations of this biomarker should be further studied in order to validate CD28 as a reliable biomarker for immunosenescence evaluation.

**Key words:** HIV, immunosenescence, lymphocytes T, B, NK, CD28 antigen, reference intervals, immunophenotyping

## INTRODUCERE

Deteriorarea sistemului imun care apare odată cu vârsta este descrisă sub termenul de imunosenescență. Îmbătrânirea globală a sistemului imun este însoțită de creștere a susceptibilității la infecții, cancer și boli autoimune, scăderea eficacității vaccinării și producerea unei afectări tisulare prin existența unei disreglări inflamatorii (3). În evaluarea mecanismelor de la baza imunosenescenței s-au utilizat diverse instrumente de studiu (8): 1) studii transversale care compară subiecții între cohorte de vârste diferite (tineri-vârstnici); 2) studii longitudinale, care urmăresc o perioadă lungă de timp subiecții vârstnici; 3) studii de îmbătrânire imună accelerată, oferite de subpopulațiile umane timectomizate, infectate cronic cu infecții virale CMV sau HIV, cât și subpopulații cu boli autoimune, ca de exemplu poliartrita reumatoidă; 4) modele celulare de îmbătrânire (senescența celulară); 5) modele reprezentate de organisme pluricelulare și modele animale.

Fiecare componentă a imunității este afectată în într-un ritm diferit în îmbătrânire, dar celulele T par să fie componenta cea mai susceptibilă. În îmbătrânire, are loc o schimbare de la celulele T naive

către celule T cu memorie, însoțită uneori de creșterea numărului și proporției de celule TCD8+ și apariția unei subpopulații dominante T reprezentată de celule anergice TCD8+CD28-, modificări atribuite încărcăturii antigenice cronice virale, în special CMV. Sistemul imun îmbătrânit are câteva caracteristici: 1) reducerea numărului și funcției celulelor stem hematopietice; 2) involuția timică; 3) reducerea celulelor T naive circulante; 4) creșterea celulelor final diferențiate T CD28-; 5) creșterea nivelului de citokine proinflamatorii circulante și a nivelului cronic de inflamație (CRP+). În cadrul studiilor longitudinale de imunitate OCTO și NONA (1), a fost prima dată definit conceptul de profil de risc imun: 1) raportul CD4/CD8 <1; 2) proliferare slabă *in vitro* a celulelor T (markeri de senescență celulară); 3) creșterea în sângele periferic a numărului celulelor CD8+ și a celulelor CD8+CD28- în sângele periferic; 4) scăderea în sângele periferic a numărului limfocitelor B; 5) prezența celulelor CD8 specifice CMV (seropozitivitate CMV). Identificarea acestui profil imun de risc a fost asociată cu mortalitate crescută la 2 ani. Nu se cunoaște dacă acest profil de risc imun este valabil și pentru alte populații din lume, având în vedere că cele două studii longitudinale au fost efectuate doar în Suedia, o țară cu particularități

socio-economice și geografice semnificativ diferite de ale multor alte țări din lume, în mod special de cele din România.

În infecția HIV, modificările imune sunt, pe de o parte, modificări ale sistemului imun adaptativ similare cu cele din imunosenescentă și, pe de altă parte, sunt datorate inflamației cronice (2,4,5). Grație terapiei antiretrovirale (ARV) actuale, pacienții infectați cu HIV trăiesc mai mult și sunt expuși la dezvoltarea de boli cronice tipice îmbătrânirii, dar această morbiditate specifică vârstei înaintate apare mai precoce și cu o rată mai mare decât în populația generală (7). Aceste observații au condus la lansarea ipotezei că în infecția HIV există o imunosenescentă accelerată, iar studiul îmbătrânirii imune accelerate din HIV a devenit una dintre noile direcții în cercetarea HIV.

Identificarea deficiențelor imune complexe de la pacienții HIV tratați ARV este importantă, nu doar pentru managementul cazurilor individuale de infecție HIV, dar și pentru că furnizează un model unic de cercetare a căilor din îmbătrânirea imună normală. Deși suprimarea replicării virale prin terapia ARV permite refacerea numărului de limfocite, în special a celulelor TCD4, s-a observat că nu toate defectele imune asociate infecției HIV sunt corectate prin această terapie. În practica curentă, evaluarea răspunsului terapeutic în infecția HIV este limitată la măsurarea încărcăturii virale și a numărului de limfocite TCD4, acesta din urmă fiind cel mai bun predictor independent al evoluției clinice. Numeroase studii însă au arătat că, în infecția HIV, funcția limfocitelor TCD4 este redusă într-un grad care nu poate fi explicat doar prin scăderea numărului lor. Un alt factor important este reprezentat de senescenta celulelor T, caracterizată prin pierderea expresiei CD28, o moleculă de suprafață cu rol costimulator în cadrul sinapsei imune dintre limfocitele T și celulele prezentatoare de antigen. S-a observat că pacienții HIV au un procent mai mare de celule TCD28- comparativ cu subiecții neinfecțați HIV. Terapia ARV determină reducerea procentului de celule TCD28-, dar valorile rămân ridicate și apropiate de cele ale subiecților vârstnici, neinfecțați cu HIV (14). Stimularea antigenică cronică conduce la acumularea de celule T oligoclonale cu specificitate pentru un număr restrâns de antigene, final diferențiate, cu precădere în compartimentul TCD8+. Aceste celule sunt caracterizate prin scurtarea telomerilor, pierderea expresiei CD28 și câștigarea expresiei CD57, fiind limfocite CD8+CD28- și CD8+CD57+ (12). Există dovezi că aceste celule T au un rol important în anumite afecțiuni precum cancerul, bolile autoimune, infecțiile cu germeni intracelulari, ca și în modificările legate de vârstă ale sistemului imun.

În prezentul studiu ne-am propus să evaluăm subseturile majore de limfocite din sângele periferic, limfocitele T cu subseturile TCD4 și TCD8, limfocitele B și celulele NK (TBNK), precum și expresia la nivel limfocitar a moleculei CD28 în conjuncție cu CD8, ca un marker de îmbătrânire a sistemului imun, la subiecți tineri și vârstnici infectați HIV și la subiecți control potriviți ca vârstă, pentru prima dată în România.

## MATERIAL ȘI METODĂ

### Subiecții studiului

Am efectuat un studiu transversal, de tip caz-control, cu subiecți infectați HIV și subiecți non-HIV aparent sănătoși, în București. Lotul total a inclus un număr de 64 de subiecți, din care 38 de subiecți infectați HIV și tratați ARV (lotul HIV) și 26 subiecți non-HIV, clinic sănătoși (lotul control). Loturile HIV și control au fost selecționate astfel încât să fie potrivite pentru vârstă și sex. Vârsta (media  $\pm$  deviația standard) a fost de 50,1 $\pm$ 18,3 ani în lotul HIV și 49,6 $\pm$ 19,5 ani în lotul control. Distribuția pe sexe (% bărbați) a fost de 66% în lotul HIV și de 44% în lotul control.

Studiul s-a derulat în cadrul Spitalului Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale Dr. Victor Babeș (SVB) și al Centrului de Diagnostic și Tratament Dr. Victor Babeș (CDTVB), în perioada martie-august 2012, conform unui protocol definit și finanțat prin contractul 124 EU-2010 (Program Plan Național II: Capacități, Modul III). Protocolul a fost aprobat de Comitetul de Etică al SVB înainte de începerea studiului, iar subiecții investigați au semnat un consimțământ informat privind participarea. Din lotul control au fost excluși subiecții care la data recrutării erau diagnosticați cu următoarele afecțiuni: cancer, boli autoimune, infecții active, infecții cronice cu HBV, HCV și HIV. Subiecții lotului HIV au fost selectați dintre pacienții dispensarizați și tratați în cadrul secțiilor de Boli Infecțioase HIV/SIDA ale SVB. Subiecții control au fost selectați în CDTVb, din baza de date creată în proiectele de cercetare anterioare, incluzând vârstnici și tineri, fără patologie acută în momentul examinării.

### Analiza hematologică

Pentru fiecare subiect a fost recoltat sânge venos periferic anticoagulat cu EDTA K3, pentru hemogramă clasică și pentru imunofenotipare, cu respectarea condițiilor preanalitice standard. Numărul total de limfocite determinat în analiza hematologică

pe o platformă automată a stat la baza valorilor absolute din evaluările de flow-citometrie ale subpopulațiilor limfocitare.

## DETERMINAREA SUBSETULUI DE LIMFOCITE

Pentru imunofenotiparea limfocitelor din sângele periferic s-a folosit analiza flowcitometrică. Instrumentul utilizat a fost FACSCalibur, Becton Dickinson cu două lasere: 488 nm și 635 nm. Pentru determinarea subseturilor limfocitare TBNK s-a utilizat kitul de diagnostic in vitro (IVD) BD MultiTest IMK, Becton Dickinson. Acest kit recomandă o marcare fără spălare (de tip *lyse no wash*) și utilizează gating-ul CD45/SSC pentru definirea populației limfocitare. Marcarea cu 4 culori implică utilizarea a două tuburi achiziționate și analizate cu softul BD MultiSET:

– Tubul 1: CD3/CD8/CD45/CD4, cu următoarea compoziție de anticorpi monoclonali: CD3 clona SK7, marcat FITC; CD8 clona SK1, marcat PE; CD45 clona 2D1 (HLe-1), marcat PerCP; CD4 clona SK3, marcat APC.

– Tubul 2: CD3/CD16+CD56/CD45/CD19, cu următoarea compoziție de anticorpi monoclonali: CD3 clona SK7, marcat FITC; CD16 clona B73.1 și CD56 clona NCAM 16.2, ambii marcați PE; CD45 clona 2D1 (HLe-1), marcat PerCP; CD19 clona SJ25C1, marcat APC.

Analiza exprimării markerului CD28 pe celulele CD8+ s-a făcut într-un eșantion de sânge periferic din aceeași probă ca în cazul analizei TBNK, utilizând kitul pentru uz exclusiv în cercetare (RUO) SimulTest CD8/CD28, Becton Dickinson. Pentru achiziție și analiză s-a folosit softul BD CellQuest cu gating FSC/SSC al populației limfocitare. În acest kit tehnica de marcare include spălarea celulelor după liza hematiilor (tehnica de tip *lyse wash*). Reactivul kitului conține anticorpi monoclonali față de CD8 (clona SK1) marcați cu FITC și față de CD28 (clona L293) marcați cu PE.

Datele rezultate din analiza flow-citometrică au fost exprimate în valori procentuale din totalul limfocitelor, cu excepția exprimării CD28 în cadrul limfocitelor CD8+, iar valorile absolute ale subseturilor limfocitare au fost calculate din numărul absolut al limfocitelor determinat prin evaluarea pe platforma hematologică.

## ANALIZA DATELOR

Datele au fost prelucrate cu softul SPSS versiunea 16.0. A fost efectuată o analiză statistică descriptivă pentru fiecare subpopulație limfocitară

de interes, în fiecare din cele două loturi, exprimând valorile ca medie, deviație standard și/sau interval de confidență 95%. Am utilizat metoda statistică t-test independent în vederea comparării mediilor între lotul HIV și lotul control. Corelațiile între vârstă și variabilele imune de interes din cele două loturi au fost exprimate prin coeficientul Pearson ( $r$ ). Valorile  $p < 0,05$  au fost considerate semnificative statistic.

## REZULTATE

### Compararea parametrilor de imunitate celulară între lotul HIV și lotul control

Determinarea subpopulațiilor limfocitare majore T, B, NK în lotul control și lotul HIV au condus la datele exprimate în Tabelul 1. Determinarea subseturilor obținute din imunofenotiparea CD8/CD28 în lotul HIV și lotul control a condus la datele exprimate în Tabelul 2.

În subpopulațiile limfocitare majore T, B, NK am obținut diferențe semnificative statistic pentru următoarele variabile, între lotul control și lotul HIV: T CD4+ (46,9 vs. 21,3%,  $p < 0,001$ ; 908 vs. 436 celule/ $\mu$ L,  $p < 0,001$ ); T CD8+ (21,9 vs. 45,9%,  $p < 0,001$ ; 446 vs. 919 celule/ $\mu$ L,  $p < 0,001$ ), CD4/CD8 (2,26 vs. 0,57,  $p < 0,001$ ). În subseturile CD8/CD28 am obținut diferențe statistice în următoarele cazuri: CD8+ total (24,2 vs. 45,4%,  $p < 0,001$ ; 499 vs. 908 celule/ $\mu$ L,  $p < 0,001$ ), CD8+CD28+ (13,3 vs. 18,4%,  $p = 0,001$ ; 273 vs. 363 celule/ $\mu$ L,  $p = 0,05$ ), CD8+CD28- (10,7 vs. 27,0,  $p < 0,001$ ; 226 vs. 544 celule/ $\mu$ L,  $p < 0,001$ ) și parametrul CD28 + din limfocitele CD8 + (55,6 vs. 41,9%,  $p < 0,001$ , 480 vs. 381 celule/ $\mu$ L,  $p < 0,001$ ).

Aceste observații susțin ideea că parametrii majori de caracterizare pentru imunitatea celulară în lotul HIV diferă semnificativ statistic față de lotul control, inclusiv pentru subseturile CD8/CD28: CD8+CD28+ și CD8+CD28-. Diferențele între celulele T (CD3+), celulele B (CD3-CD19+) și celulele NK (CD3-CD16+/CD56+) între cele două loturi nu sunt semnificative.

Evaluarea compartimentului de celule T este o componentă cheie în evaluarea atât a imunoseneșcenței, cât și în monitorizarea infecției HIV. Singurul marker independent modificat într-un mod similar în infecția HIV și îmbătrânire a fost procentul de CD28+ din limfocitele CD8+, care a fost semnificativ mai scăzut la subiecții HIV comparativ cu subiecții control (media 41,9% vs. 55,6%,  $p = 0,001$ ) și la subiecții vârstnici control comparativ cu tinerii control (46,5% vs. 63,2%,  $p = 0,004$ ). Aceste date sunt reprezentate în Tabelele 3 și 4.

**TABELUL 1.** Subpopulațiile limfocitare T (total, CD4, CD8), B și NK în lotul control și lotul HIV

Tip celular	Lot control (n = 26)		Lot HIV (n = 38)	
	Proporția din total limfocite (%) (95% interval de confidență)	Valoare absolută (celule/ $\mu$ L) (95% interval de confidență)	Proporția din total limfocite (%) (95% interval de confidență)	Valoare absolută (celule/ $\mu$ L) (95% interval de confidență)
Limfocite (total)	100	2.042 (1.856-2.228)	100	2.030 (1.843-2.218)
Limfocite T	70,9 (69,1-72,8)	1.438 (1.294-1.581)	71,9 (68,6-75,1)	1.452 (1.310-1.595)
Limfocite T CD4+	46,9 (44,3-49,4)	908 (787-1.029)	21,3 (17,6-25,1)	436 (353-519)
Limfocite T CD8+	21,9 (20,2-23,7)	446 (389-503)	45,9 (41,2-50,7)	919 (803-1.035)
Raport CD4/CD8	2,26(1,97-2,55)		0,57 (0,42-0,72)	
Limfocite B	12,0 (8,7-14,2)	239 (202-277)	11,2 (9,3-13,2)	236 (185-287)
Celule NK	12,6 (9,6-16,1)	252 (212-291)	12,1 (10,0-14,2)	243 (193-293)

**TABELUL 2.** Subseturile CD8/CD28 în lotul control și lotul HIV

Tip celular	Lot control (n = 26)		Lot HIV (n = 38)	
	Proporția din total limfocite (%) (95% interval de confidență)	Valoare absolută (celule/ $\mu$ L) (95% interval de confidență)	Proporția din total limfocite (%) (95% interval de confidență)	Valoare absolută (celule/ $\mu$ L) (95% interval de confidență)
Limfocite CD8 + total	24,2 (22,1-26,2)	499 (427-571)	45,4 (41,0-49,7)	908 (801-1.014)
Limfocite CD8+CD28+	13,3 (11,7-15,0)	273 (230-317)	18,4 (15,9-20,8)	363 (317-409)
Limfocite CD8 + C D28-	10,7(8,9-12,6)	226 (175-276)	27,0 (22,6-31,2)	544 (452-636)
CD28+/CD8 + total	55,6 (49,3-61,8)	381 (344-432)	41,9 (36,8-47,0)	466 (428-547)

**TABELUL 3.** Semnificația statistică a diferenței dintre subpopulațiile limfocitare T (total, CD4, CD8), B și NK lotului HIV și control

Variabilă	Comparația valorilor relative	Comparația valorilor absolute
Limfocite (total)	–	0,927
Limfocite T	0,615	0,883
Limfocite T CD4+	< 0,001	< 0,001
Limfocite T CD8+	< 0,001	< 0,001
Raport CD4/CD8	< 0,001	
Limfocite B	0,558	0,923
Celule NK	0,743	0,778

**TABELUL 4.** Semnificația statistică a diferenței între subseturile CD8/CD28 în lotul control și lotul HIV

Variabilă	Comparația valorilor relative	Comparația valorilor absolute
Limfocite CD8 + total	< 0,001	< 0,001
Limfocite CD8 + CD28+	0,003	0,005
Limfocite CD8 + CD28-	< 0,001	< 0,001
CD28+/CD8 + total	< 0,001	0,027

### Influența vârstei asupra subpopulațiilor limfocitare în lotul control și în lotul HIV

Testarea corelației liniare în cele două loturi, între variabila „vârstă” și variabila imună studiată, a condus la datele din Tabelele 5 și 6.

În Tabelul 5 sunt reprezentate corelațiile subpopulațiilor limfocitare majore TBNK cu vârsta în lotul control și lotul HIV.

Pentru lotul control s-a observat o corelație liniară negativă a vârstei cu valorile procentuale ale următorilor parametri: limfocite, T, TCD8+ și B, ceea ce înseamnă că odată cu înaintarea în vârstă acești parametri descresc. Pentru valorile absolute ale subpopulațiilor limfocitare s-au observat același corelații negative ca pentru valorile procentuale, cu excepția TCD4+, unde direcția corelației s-a inversat. O corelație liniară pozitivă s-a observat între vârstă și celulele NK în valoare absolută și procentuală și între vârstă și CD4/CD8. Corelația vârstă-parametri imuni a fost slabă ( $r < 0,4$ ) pentru majoritatea parametrilor studiați, iar o corelație medie ( $0,4 < r < 0,8$ ) am obținut doar pentru TCD3 în valoare absolută ( $r = 0,408$ ) și NK în valoare procentuală ( $r = 0,468$ ). În ceea ce privește semnificația statistică a acestor diferențe, am putut constata o diferență semnificativă ( $p < 0,05$ ), doar pentru TCD8+ în valoare absolută ( $p = 0,038$ ).

În lotul HIV am obținut corelații pozitive între vârstă și parametri imuni în valoare procentuală pentru parametrii TBNK, cu excepția limfocitelor T și TCD8. În ceea ce privește valorile absolute, corelația cu vârsta a fost pozitivă, cu excepția raportului CD4/CD8, care a fost negativ. Forța acestor corelații a fost slabă pentru toți parametrii studiați ( $r < 0,4, p > 0,05$ ). Nu s-a înregistrat nici o diferență semnificativă prin înaintarea în vârstă, în lotul nostru HIV.

**TABELUL 5.** Corelația între vârstă și subpopulațiile limfocitare majore (exprimate procentual și în valoare absolută) în cele două loturi

Variabilă	Lot control (n = 26)				Lot HIV (n = 38)			
	Analiza valorilor relative		Analiza valorilor absolute		Analiza valorilor relative		Analiza valorilor absolute	
	Coefficient Pearson	Valoare P	Coefficient Pearson	Valoare P	Coefficient Pearson	Valoare P	Coefficient Pearson	Valoare P
Limfocite (total)	-	-	-0,344	0,085	-	-	0,161	0,333
Limfocite T	-0,144	0,484	-0,367	0,065	-0,287	0,080	0,029	0,864
Limfocite T CD4+	0,171	0,403	-0,052	0,800	<0,001	0,999	0,068	0,685
Limfocite T CD8+	-0,198	0,331	-0,408	<b>0,038</b>	-0,143	0,393	0,022	0,894
Raport CD4/CD8	-	-	0,228	0,262			-0,011	0,950
Limfocite B	-0,205	0,316	-0,375	0,059	0,225	0,175	0,243	0,141
Celule NK	0,468	0,056	0,140	0,495	0,219	0,187	0,241	0,145

În Tabelul 6 sunt reprezentate corelațiile subseturilor CD8/CD28 cu vârsta în lotul control și lotul HIV.

Pentru lotul control s-a observat o corelație negativă între vârstă și valorile procentuale și absolute ale CD8+total, CD8+CD28+, CD8+CD28-, CD28+/CD8+, cu excepția valorii procentuale CD8+CD28-. Corelația negativă semnifică faptul că, odată cu înaintarea în vârstă, acești parametri imuni descresc în lotul nostru control. Am obținut corelații medii ( $0,4 < r < 0,8$ ) pentru valorile procentuale ale parametrilor CD8+CD28+ ( $r = 0,493$ ) și CD28+/CD8+ ( $r = 0,401$ ) și pentru valorile absolute ale parametrilor: CD8 + total ( $r = 0,417$ ) și CD8 + CD28+ ( $r = 0,623$ ). În ceea ce privește semnificația statistică a acestor diferențe, am putut constata existența unei diferențe semnificative doar în cazul CD8+CD28+ în valoare procentuală ( $p = 0,010$ ). În lotul nostru control, odată cu înaintarea în vârstă, am observat o descreștere a subpopulației CD8+CD28+.

În lotul HIV corelații negative cu vârsta au fost obținute pentru toți parametrii imuni în valoare procentuală, iar corelații pozitive au fost obținute pentru valorile absolute CD8+total și CD8+CD28-. Forța acestor corelații a fost slabă pentru toți parametrii studiați ( $r < 0,4$ ) și nu s-au înregistrat diferențe semnificative pentru acest subset imun, în lotul nostru HIV.

În Fig. 1 sunt reprezentate corelațiile vârstă-parametri imuni, care au fost identificate ca fiind statistic semnificative, în lotul control.

## DISCUȚII

Rezultatele obținute în studiul nostru sunt un prim efort de a stabili referințe naționale pentru imunofenotiparea limfocitară la adulții sănătoși cu vârste inclusiv mai mari de 65 de ani, corespunzând unui important segment de populație în România. În diferite țări au fost efectuate studii pentru stabilirea intervalelor de referință naționale pentru subseturile limfocitare, tot mai frecvent fiind extinse și la populații vârstnice. Reichert și alții au publicat în 1991, din partea companiei Becton Dickinson (9), intervale de referință pentru subpopulațiile limfocitare majore, valabile pentru indivizii de origine caucaziană. Aceste referințe sunt cele incluse în software-ul flow-citometrelor produse de compania Becton Dickinson, inclusiv al celui utilizat în prezentul studiu. Există totuși o recomandare din partea companiei Becton Dickinson ca fiecare utilizator să își constituie propriile intervale de referință, deoarece există variații geografice semnificative. În plus, în cei 30 de ani de la publicarea acelor rezultate, pe plan internațional au fost publicate și alte rezultate care susțin variabilitatea geografică, inclusiv în România, în 1995 (10). După

**TABELUL 6.** Corelația între vârstă și subseturile CD8/CD28 (exprimate procentual și în valoare absolută) în cele două loturi

Variabilă	Lot control (n = 26)				Lot HIV (n = 38)			
	Analiza valorilor relative		Analiza valorilor absolute		Analiza valorilor relative		Analiza valorilor absolute	
	Coefficient Pearson	Valoare P	Coefficient Pearson	Valoare P	Coefficient Pearson	Valoare P	Coefficient Pearson	Valoare P
Limfocite CD8+ total	-0,297	0,141	-0,417	<b>0,034</b>	-0,177	0,288	0,005	0,978
Limfocite CD8+CD28+	-0,493	<b>0,010</b>	-0,623	<b>0,001</b>	-0,131	0,431	-0,054	0,749
Limfocite CD8+CD28-	0,113	0,581	-0,058	0,780	-0,102	0,541	0,032	0,849
CD28+/ CD8+total	-0,401	<b>0,042</b>	-0,526	<b>0,012</b>	-0,126	0,452	-0,042	0,902

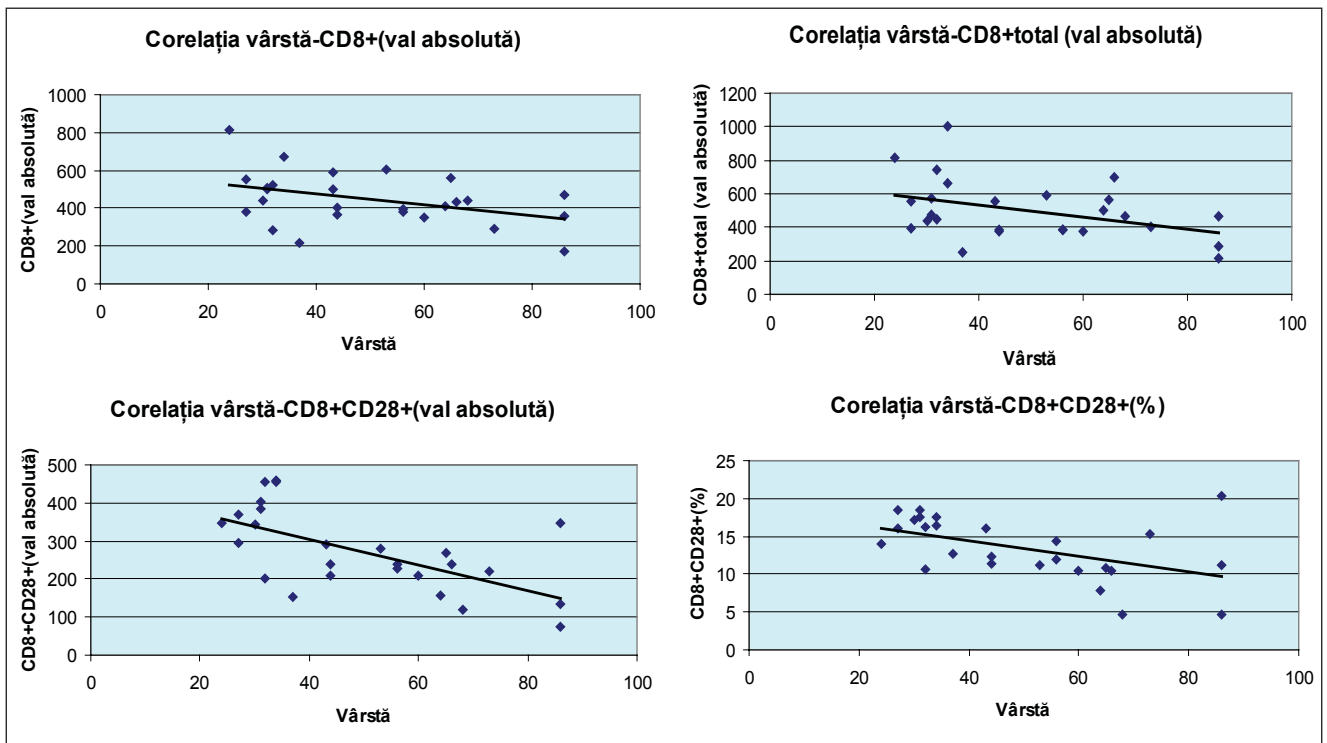


FIGURA 1. Corelația vârstă-parametri imuni cu semnificație statistică, în lotul control

acest studiu din 1995, nu există alte publicații pentru regiunea noastră geografică. Rezultatele imunofenotipării limfocitare în cohorta noastră sunt minimal diferite față de rezultatele publicate de Roman și alții în 1995 (10), dar sunt asemănătoare cu cele publicate de Reichter și alții (9). Acuratețea datelor de flow-citometrie este mult îmbunătățită când se stabilesc intervale de referință naționale, cunoscută fiind variația largă a limfocitelor determinată de vârstă, sex, rasă.

În lotul nostru control, în ceea ce privește fenotipul celular T, am constatat că, odată cu înaintarea în vârstă, subpopulația CD8+CD28+ exprimată procentual și în valoare absolută descrește. Scăderea cu vârsta a valorilor absolute pentru TCD8+ ( $p = 0,038$ ) și CD8+ total din lotul nostru ar fi în concordanță cu unele studii anterioare, care au arătat o scădere generalizată a numărului celulelor T (CD3+, CD4+, CD8+) în valoare absolută, fiind considerată o caracteristică a îmbătrânirii sistemului imun (11,15). Alte studii au arătat o scădere a valorilor procentuale și absolute pentru subpopulațiile CD3+, CD4+ și CD8+ (16) sau lipsa unor modificări semnificației cu vârsta (13), discrepanță care reflectă mai probabil diferențele din strategia de recrutare a donatorilor. Evaluarea expresiei CD28 la nivelul limfocitelor periferice CD8+ poate fi un marker util de imunosenescență, atât la subiecții sănătoși, cât și la subiecții infectați HIV. Limfocitele care exprimă CD28+ sunt găsite mai puțin frecvent

la pacienții HIV indiferent de vârstă și la subiecții vârstnici control.

În ceea ce privește limfocitele B, în studiul nostru nu am înregistrat o modificare semnificativă legată de vârstă nici în valoare procentuală și nici absolută. Această lipsă de schimbare legată de vârstă este în concordanță cu observații anterioare (9,13) dar în contradicție cu raportări care încorporează centenari (2,6). În ceea ce privește celulele NK, în studiul nostru am înregistrat o creștere cu vârsta, marginal semnificativă, doar în cazul valorilor procentuale, nu și în cazul valorilor absolute, în concordanță cu unele studii (13), dar nu și cu altele (11,6), diferențele putând fi explicate pe baza unor caracteristici fenotipice și/sau clone de anticorpi monoclonali folosite pentru definirea celulelor NK.

Diferențele observate între valoarea procentuală și absolută a variabilelor studiate indică faptul că, în interpretarea datelor, valorile procentuale ar trebui să fie interpretate prioritar față de cele absolute, având în vedere multitudinea de factori ce pot determina creșterea și scăderea semnificativă, în limitele normalului sau în afara acestuia, a numărului absolut de limfocite, număr care constituie baza de calcul pentru valorile absolute ale subpopulațiilor limfocitare. Subpopulația CD8-CD28+, care include limfocitele TCD4+CD8+ semnificativ diferite la pacienții HIV față de non-HIV (14), a fost unicul fenotip CD8CD28 pentru care nu am găsit o

diferență cu semnificație statistică între lotul HIV și lotul control. Acest fenomen poate fi explicat prin heterogenitatea clinică a lotului HIV din studiul nostru, în ceea ce privește factorii care afectează imunitatea independent de vârstă: nadirul numărului de limfocite TCD4, durata în ani de infecție HIV și de tratament ARV, precum și gradul succesului terapeutic până la și respectiv la momentul evaluării.

În concluzie, în lotul nostru de referință s-au înregistrat diferențe legate de vârstă în sensul unei corelații inverse pentru TCD8+ (valoare absolută) și CD8+CD28+ (procent și valoare absolută), dar

nu s-au înregistrat diferențe legate de vârstă pentru parametrii T, TCD4+, B, NK și CD8+CD28-. Studiul nostru se adaugă eforturilor internaționale de stabilire a intervalelor de referință locale pentru subpopulațiile limfocitare, care să includă și populația vârstnică, fiind înregistrate puține încercări în acest sens la noi în țară. Corelațiile clinice ale biomarkerului CD28+/CD8+ ar trebui studiate în continuare, în vederea validării parametrului CD28, ca un biomarker util în evaluarea imunosensescenței.

## BIBLIOGRAFIE

1. Wikby A., Johansson B., Ferguson F. – The OCTO and NONA immune longitudinal studies: a review of 11 years studies of Swedish very old humans. In: Graham Pawelec, Editor(s), *Advances in Cell Aging and Gerontology*, Elsevier, 2002, Volume 13, Pages 1-16
2. Bestilny L.J., Gill M.J., Mody C.H., Riabowol K.T. – Accelerated replicative senescence of the peripheral immune system induced by HIV infection. *AIDS* 2000; 14:771-780.
3. Deeks S.G. – HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annual Review of Medicine* 2010; 62: 141-155. Doi: 10.1146/annurev-med-042909-093756.
4. Deeks S.G., Verdin E., McCune J.M. – Immunosenescence and HIV. *Current Opinion in Immunology* 2012; 24:1-6.
5. Dock J.N., Effros R.B. – Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. *Aging and Disease* 2011; 2(5): 382-397.
6. Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A., Marini L., Loreto F., Modesti M., Quaglino D. – Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis. *Am J Hematol* 2001;67:63–72.
7. Guaraldi G., Orlando G., Zona S., Menozzi M., Carli F., Garlassi E., Berti A., Rossi R., Roverato A., Palella F. – Premature Age-Related Comorbidities Among HIV-Infected Persons Compared With the General Population. *Clinical Infectious Diseases* 2011; 53 (11):1120-6.
8. Le Saux S., Weyand C.M., Goronzy J.J. – Mechanisms of immunosenescence: lessons from models of accelerated immune aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012. 1247: 69-82. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06297.x.
9. Reichert T., DeBruyere M., Deneys V., și col. – Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 60:190–208.
10. Roman S., Moldovan I., Călugăru A. și col. – Lymphocyte subset reference ranges in Romanian adult Caucasians. *Rom J Intern Med* 1995; 33 (1-2):27-36
11. Sansoni P., Cossarizza A., Brianti V., și col. – Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* 1993; 82:2767–2773.
12. Strioga M., Pasukoniene V., Characiejus D. – CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011; 134(1): 17-32. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x. Epub 2011 Jun 29.
13. Stulnig T., Maczek C., Bock G., Majdic O., Wick G. – Reference intervals for human peripheral blood lymphocyte subpopulations from healthy young and aged subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108:205–210.
14. Tassiopoulos K., Landay A., Collier A.C., Connick E., Deeks S.G., Hunt P., Lewis D.E., Wilson C., Bosch R. – CD28-negative CD4+ and CD8+ T cells in antiretroviral therapy-naive HIV-infected adults enrolled in adult clinical trials group studies. *J Infect Dis.* 2012; 205 (11):1730-8. Epub 2012 Mar 23.
15. Utsuyama M., Hirokawa K., Kurashima C., Fukayama M., Inamatsu T., Suzuki K., Hashimoto W., Sato K. – Differential age-change in the numbers of CD4+CD45RA+ and CD4+CD29+ T cell subsets in human peripheral blood. *Mech Ageing Dev* 1992;63:57–68.
16. Xu X., Beckman I., Ahern M., Bradley J. – A comprehensive analysis of peripheral blood lymphocytes in healthy aged humans by flow cytometry. *Immunol Cell Biol* 1993; 71(Pt6):549–557.