

А.І. Піддубна, М.Д. Чемич

ІМУНОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТА ПРОФІЛЬ ЦИТОКІНІВ У ХВОРИХ НА ВІЛ-ІНФЕКЦІЮ

Сумський державний університет

Наведено зміни профілю цитокінів IL-4, IL-10, TNF- α та особливості перебігу захворювання у ВІЛ-інфікованих осіб залежно від рівня імуносупресії. Встановлено, що імунний статус пацієнтів з ВІЛ характеризується недостатністю клітинного компартменту з дисбалансом співвідношення імунокomпетентних клітин та підвищеною продукцією прозапального TNF- α і протизапального IL-10.

Ключові слова: ВІЛ-інфекція, цитокіни, клітинний імунітет.

Вірус імунodefіциту людини на теперішній час обумовлює пандемію, внаслідок чого зростання захворюваності на ВІЛ-інфекцію є важливою медико-соціальною проблемою [1]. Проте численні дослідження, присвячені вивченню механізмів патогенезу недуги і особливостей перебігу захворювання, не знаходять однозначного вирішення.

Одним з факторів, що впливають на реплікацію вірусу в організмі, є цитокіни, деякі з яких здатні сприяти реплікації ВІЛ, підвищуючи експресію регуляторних генів збудника [2]. Чимало авторів вказують на те, що в основі відповіді імунної системи на антигени вірусу лежить дисбаланс інтерлейкінів, які продукуються Т-хелперами 1-го і 2-го типу. Так, при прогресуванні хвороби пригнічується Т1-хелперна відповідь, що призводить до порушення стимуляції клітинного компоненту. Разом з цим відбувається зростання рівнів протизапальних цитокінів, які, у свою чергу, обумовлюють відносно малоефективний антитільний опір [3-5].

TNF- α відіграє вирішальну роль в експресії вірусного геному при ВІЛ-інфекції. Підвищення сироваткової концентрації TNF- α при прогресуванні недуги відмічається багатьма дослідниками, більшість з яких підкреслюють кореляцію даного підвищення зі зниженням кількості CD4+ лімфоцитів і тяжкістю клінічної картини захворювання [6-8]. Значення IL-10 у розвитку хвороби

полягає в його здатності як знижувати, так і підвищувати реплікацію вірусу залежно від присутності інших цитокінів. Високі рівні IL-10 зафіксовані у сироватці інфікованих осіб на пізніх стадіях хвороби [9, 10]. Більш суперечливі дані про роль IL-4: незважаючи на окремі повідомлення про зниження рівня цитокіну, чимало дослідників зазначають підвищення його концентрації при прогресуванні інфекції [2, 11, 12].

Таким чином, баланс цитокінів відіграє важливу роль у регулюванні гомеостазу імунної системи і впливає на перебіг ВІЛ-інфекції, а дослідження змін цитокінового статусу у ВІЛ-інфікованих осіб дозволить краще зрозуміти патогенез захворювання і надасть додаткову інформацію про механізм прогресування недуги.

Пацієнти і методи

Під спостереженням перебувало 59 ВІЛ-інфікованих осіб, серед яких було 40 (67,8 %) чоловіків та 19 (32,2 %) жінок у віці (32,61 \pm 0,87) років, які перебували на стаціонарному лікуванні в Сумській обласній клінічній інфекційній лікарні ім. З.Й. Красовицького (СОКІЛ). Пацієнти були розподілені на групи залежно від рівня CD4+ Т-лімфоцитів. До I групи увійшли 26 осіб з рівнем Т-хелперів \geq 350 клітин/мкл, до II – 33 особи з рівнем Т-хелперів \leq 200 клітин/мкл. Групу порівняння склали співставні за статтю і віком 30 клінічно здорових донорів крові.

Методом ІФА проведено кількісне визначення рівня IL-4, IL-10, TNF- α (тест-системи «Вектор-Бест», м. Новосибірськ, РФ) у сироватці крові згідно інструкцій заводу виробника на базі клініко-діагностичної лабораторії СОКІЛ. Параметри клітинного компартменту імунної системи (кількість CD3+ лімфоцитів, CD4+ субпопуляції Т-хелперів, CD8+ субпопуляції Т-супресорів в 1 мкл крові, індекс співвідношення субпопуляції лімфоцитів CD4+/CD8+) отримані на базі імунологічної лабораторії обласного центру профілактики і боротьби з ВІЛ-інфекцією/СНІДом. Крім цього, прово-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

дидись загальноприйняті та передбачені протоколом обстеження. Включення осіб у дослідження проводилося лише за їх письмовою інформованою згодою.

Результати досліджень та їх обговорення

Вивчаючи соціо-демографічні дані встановлено, що ВІЛ-інфіковані особи досліджуваних груп не відрізнялися за гендерною, віковою ознака-

ми та шляхом інфікування вірусом (табл. 1). Привертає увагу той факт, що серед пацієнтів групи II зафіксовано достовірно менший стаж недуги. Так, в осіб з рівнем CD4+ Т-лімфоцитів <200 клітин/мкл середня кількість років, що минули з часу встановлення діагнозу ВІЛ-інфекції до моменту госпіталізації, була у 2,5 разу меншою, ніж в осіб з групи I ($p < 0,01$).

Таблиця 1

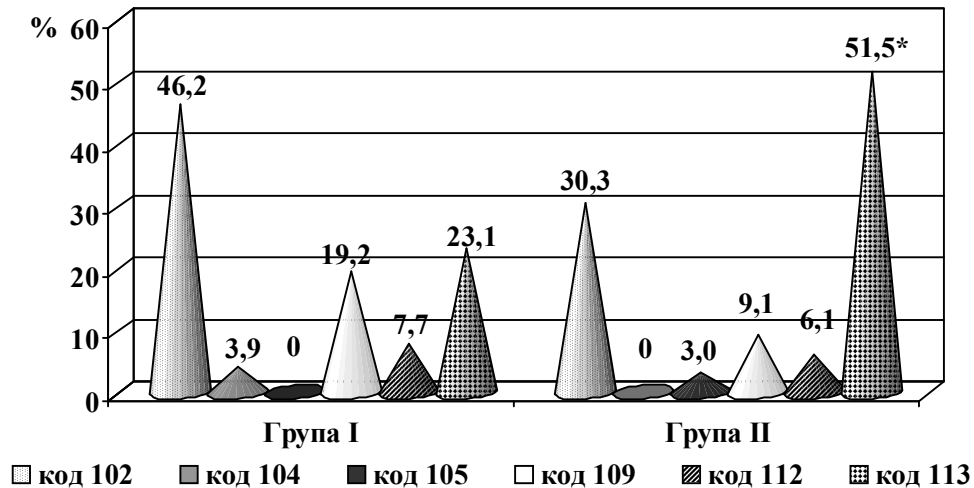
Соціо-демографічна характеристика обстежених пацієнтів з ВІЛ-інфекцією ($M \pm m$)

| Показник | Група I (n=26) | Група II (n=33) |
|---|---------------------|---------------------|
| Середній вік, років | 30,50±0,89 | 34,27±1,70 |
| Чоловіки, абс. / % | 16 / (61,54±9,73) | 24 / (72,72±7,87) |
| Парентеральний шлях інфікування, абс. / % | 20 / (76,92±8,43) % | 20 / (60,61±8,64) % |
| Статевий шлях інфікування, абс. / % | 6 / (23,08±8,43) % | 13 / (39,39±8,64) % |
| Перебувають на ВААРТ, абс. / % | 9 / (34,62±9,51) % | 7 / (21,21±7,23) % |
| Стаж ВІЛ-інфекції, років | 4,43±0,68 | 1,81±0,40 * |

Примітка: * – достовірність різниці показника щодо пацієнтів групи I, $p < 0,01$.

При структурному розподілі груп за показником причини проходження тестування на наявність Ат до ВІЛ 1/2 (мал. 1) не виявлено достовірних відмінностей при обстеженні пацієнтів: як споживачів ін'єкційних наркотиків (код 102); в яких виявлені хвороби, що передаються статевим шляхом (код 104); які мали чисельні незахищені сексуальні контакти (код 105); які перебувають у

місцях позбавлення волі (код 112); вагітних (код 109). Проте, у групі II зареєстрована достовірно більша кількість пацієнтів, обстежених через наявність клінічних показань для проходження тестування на ВІЛ-інфекцію (код 113), що разом з малою тривалістю інфікування може вказувати на пізніше виявлення недуги серед даного контингенту вже на стадії клінічних проявів.



Мал. 1. Структура клінічних груп залежно від причини проходження тестування на ВІЛ-інфекцію.

Примітка (тут і далі): * – достовірна різниця показника щодо групи I, $p < 0,05$.

Зіставлення клінічних стадій ВІЛ-інфекції пацієнтів досліджуваних груп дозволило виявити, що

лише в осіб з рівнем Т-хелперів ≥ 350 клітин/мкл була зафіксована стадія безсимптомного носій-

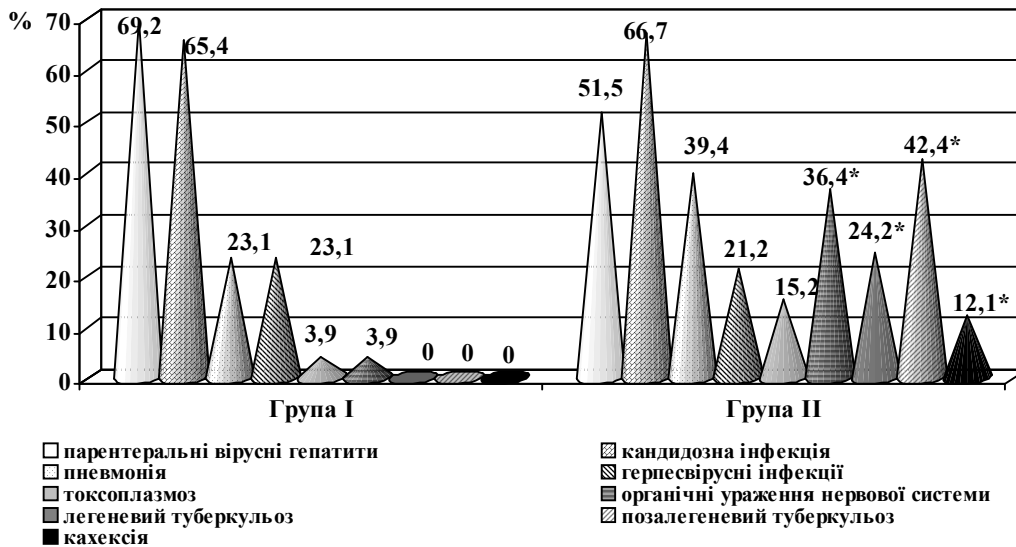
ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ства, а клінічна стадія III реєструвалася у 2,7 разу частіше ($p < 0,05$). У групі II домінували пацієнти з термінальною стадією захворювання (показник перевищив аналогічний серед осіб групи I у 3,9 разу, $p < 0,05$).

У пацієнтів групи I на момент звернення за медичною допомогою загальний стан був розцінений як середнього ступеня тяжкості у 92,3 %, що в 1,8 разу більше, ніж серед представників групи II ($p < 0,05$). У хворих з рівнем імунокомпетентних клітин ≤ 200 клітин/мкл тяжкий стан зафік-

совано у 30,3 % випадків, вкрай тяжкий стан – у 18,2 %, що перевищує відповідні показники групи I у 3,9 та 18,2 разу відповідно ($p < 0,05$).

Вивчення структури патології, асоційованої з ВІЛ, вказало на те, що найбільш розповсюдженими були інфекції, спричинені грибами роду *Candida* та вірусами гепатиту В і С (мал. 2). Лише у когорті осіб з рівнем $CD4^+$ Т-лімфоцитів ≤ 200 клітин/мкл діагностовано сухоти, кахексію; достовірно частіше виявлено органічні ураження ЦНС (у 9,3 разу).



Мал. 2. Клінічні прояви у пацієнтів з ВІЛ-інфекцією.

У пацієнтів індекс опортуністичних інфекцій (кількість інфекцій, що виявлені у хворого) коливався від 1 до 5. В осіб з вираженим імунodefіцитом цей показник був вищим – ($2,49 \pm 0,23$) у групі II проти ($1,65 \pm 0,32$) у I ($p < 0,05$).

Як видно з табл. 2, у хворих з ВІЛ-інфекцією при дослідженні показників клітинного компартменту імунітету реєструвалися суттєво знижені показники $CD4^+$ Т-лімфоцитів порівняно зі здоровими особами (група I – у 2,2; II – у 8,6 разу), зни-

ження коефіцієнту співвідношення $CD4^+/CD8^+$ (група I – у 2,8; II – у 5,3 разу). Середні значення пулу $CD3^+$, $CD8^+$ лімфоцитів у пацієнтів з рівнем Т-хелперів ≥ 350 клітин/мкл достовірно перевищували такі значення осіб з групи порівняння та II. Зміни в імунному статусі пацієнтів групи II мали більш виражений характер, що підтверджується наявністю достовірної різниці показників з когортою хворих групи I ($p < 0,05$).

Таблиця 2

Показники клітинного імунітету в обстежених ВІЛ-інфікованих осіб ($M \pm m$)

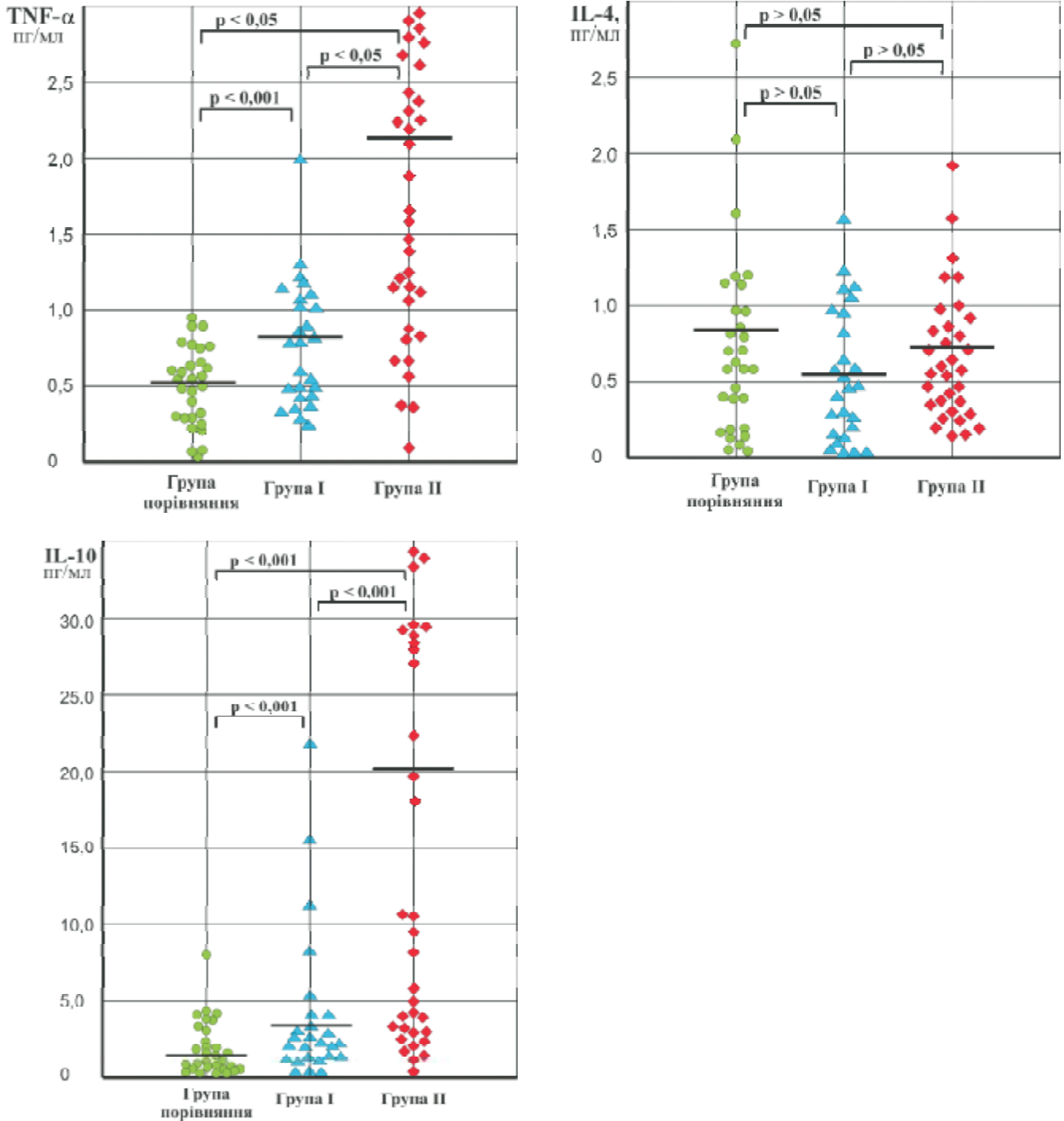
| Показник | Група порівняння (n=30) | Група I (n=26) | Група II (n=33) |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------------|
| $CD4^+$, клітин в 1 мкл крові | $992,47 \pm 29,53$ | $446,35 \pm 20,07^*$ | $115,21 \pm 11,72^{*,**}$ |
| $CD3^+$, клітин в 1 мкл крові | $1330,77 \pm 54,39$ | $1483,08 \pm 38,40^*$ | $835,79 \pm 100,65^{*,**}$ |
| $CD8^+$, клітин в 1 мкл крові | $828,17 \pm 16,01$ | $1042,85 \pm 32,01^*$ | $602,91 \pm 95,72^{*,**}$ |
| $CD4^+/CD8^+$ | $1,21 \pm 0,04$ | $0,43 \pm 0,01^*$ | $0,23 \pm 0,03^{*,**}$ |

Примітка: * – достовірна різниця показника щодо осіб групи порівняння, $p < 0,001$; ** – щодо групи I, $p < 0,001$.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

У цитокіновому профілі ВІЛ-інфікованих (мал. 3) спостерігалось збільшення рівня прозапального цитокіну *TNF-α* порівняно з контролем (група I – $(0,77 \pm 0,08)$, II – $(2,34 \pm 0,69)$, група порівняння – $(0,51 \pm 0,32)$ пг/мл) та протизапального *IL-10*

(група I – $(3,99 \pm 0,99)$, II – $(20,08 \pm 4,44)$, група порівняння – $(1,68 \pm 0,32)$ пг/мл, $p < 0,001$). Достовірно значущої різниці у продукції *IL-4* серед обстежених контингентів виявлено не було.



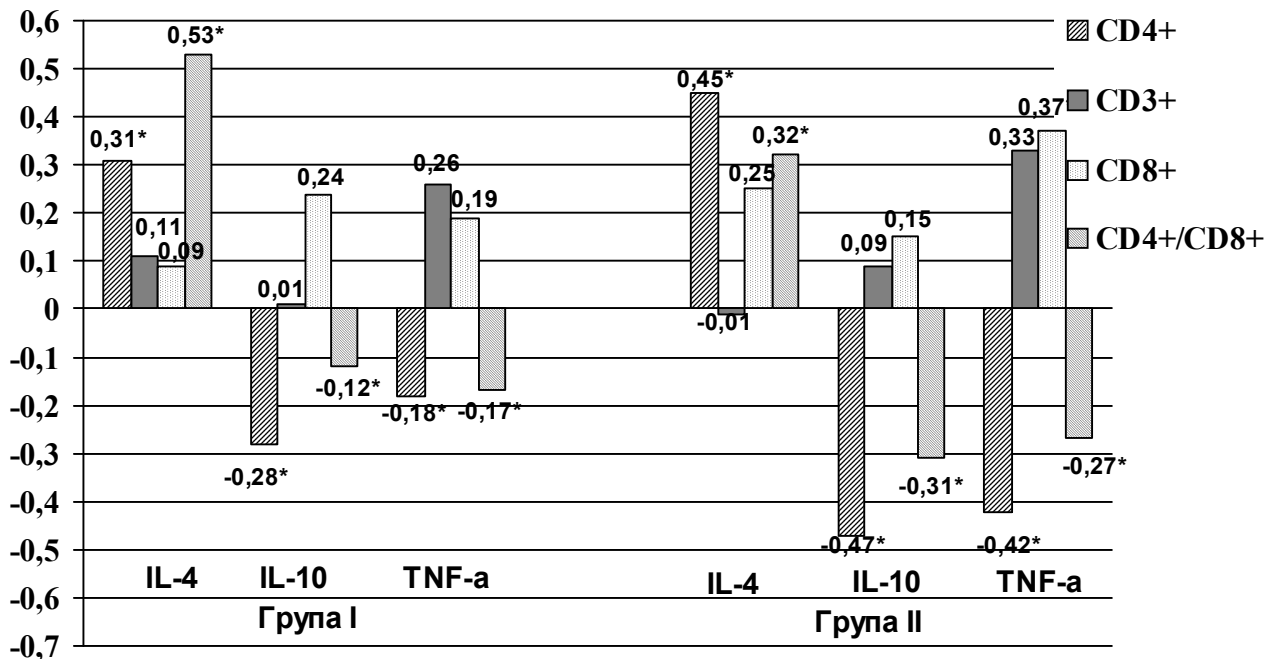
Мал. 3. Показники сироваткової концентрації цитокінів у ВІЛ-інфікованих осіб.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

У пацієнтів з рівнем CD4+ Т-лімфоцитів ≤ 200 клітин/мкл зафіксовано значне підвищення вмісту *TNF- α* та *IL-10* порівняно з особами групи I ($p < 0,05$), що обумовлює наявність глибокого дисбалансу імунної відповіді на пізніх стадіях захворювання. Серед ВІЛ-інфікованих групи II середній рівень сироваткової концентрації *TNF- α* перевищив відповідний показник групи I у 3 рази ($p < 0,05$). Значне зростання концентрації цитокіну зафіксовано в осіб з вираженим імунодефіцитом при порівнянні значень *IL-10* (у групі II виявився у 5 разів вищим, $p < 0,05$), що може опосередковано свідчити про активніше залучення *IL-10* у процесі прогресуван-

ня недуги. На користь даного припущення також вказує сила кореляційних зв'язків у пацієнтів групи II між концентрацією даного цитокіну та індексом опортуністичних інфекцій порівняно з аналогічними показниками *TNF- α* (*IL-10*: $r = 0,23$, $p < 0,05$; *TNF- α* : $r = 0,17$); тяжкістю загального стану пацієнта (*IL-10*: $r = 0,43$, $p < 0,05$; *TNF- α* : $r = 0,25$, $p < 0,05$).

При дослідженні кореляційних зв'язків у групах пацієнтів з ВІЛ-інфекцією виявлено зворотний зв'язок різної сили між кількістю CD4-клітин, індексом співвідношення CD4+/CD8+ лімфоцитів та рівнями *IL-10* і *TNF- α* (мал. 4).



Мал. 4. Кореляційні зв'язки між показниками клітинного імунітету та профілем цитокінів у досліджуваних групах. Примітка: * – достовірність кореляційного зв'язку, $p < 0,05$.

Необхідно відзначити, що в осіб зі значно вираженим імунодефіцитом залежність рівня імунокомпетентних клітин і сироваткової концентрації цитокінів значніша. Так, у групі з рівнем Т-хелперів ≥ 350 клітин/мкл кореляційний зв'язок був зворотний слабкий (*IL-10*: $r = -0,28$, $p < 0,05$; *TNF- α* : $r = -0,18$), серед осіб з рівнем CD4-лімфоцитів ≤ 200 клітин/мкл зафіксовано зворотний зв'язок середньої сили (*IL-10*: $r = -0,47$, $p < 0,05$; *TNF- α* : $r = -0,42$, $p < 0,05$).

Виявлені зміни субпопуляції лімфоцитів у ВІЛ-інфікованих осіб, що характеризуються зміною кількості імунокомпетентних клітин з фенотипом

CD+ і коефіцієнта їх співвідношення, підтверджують сучасну концепцію глобального імунного дисбалансу при прогресуванні захворювання [4, 6, 13].

Отримані результати співпадають з даними зарубіжних дослідників – баланс цитокінів відіграє важливу роль у ВІЛ-асоційованій імунній дисфункції, коли активується як протизапальна, так і прозапальна цитокінові ланки, з підвищенням вмісту *IL-10* і *TNF- α* [6, 8-10]. Також доведена асоціація високого рівня циркулюючого *TNF- α* з несприятливим перебігом інфекції [2, 4]. Припус-

кається, що *IL-10* має негативні наслідки при ВІЛ-інфекції, через здатність безпосередньо впливати на реплікацію вірусу у Т-хелперах, моноцитах і дендритних клітинах [9]; диференційно модулювати апоптоз клітин пулу CD4+ і CD8+ лімфоцитів [14]; також *IL-10* може відновлювати блокаду Т-клітинної проліферативної відповіді у пацієнтів з відносно збереженою кількістю Т-хелперів, але ця здатність втрачається при прогресуванні недуги [15].

Висновки

1. Серед обстежених ВІЛ-інфікованих з кількістю CD4+ лімфоцитів ≤ 200 клітин/мкл достовірно частіше реєструвалися пізні стадії захворювання, тяжкий перебіг недуги, легеневої та позалегенової туберкульоз, органічні ураження нервової системи, кахексія, вищий індекс опортуністичних інфекцій.

2. Імунний статус ВІЛ-інфікованих осіб характеризується недостатністю клітинної ланки імунної системи і змінами у цитокиновому статусі з підвищеною продукцією прозапального *TNF- α* і проти-запального *IL-10*.

3. Імунний дисбаланс, що обумовлений змінами клітинного компонента і рівнем цитокинів, більш виражений у ВІЛ-інфікованих осіб з рівнем CD4+ лімфоцитів ≤ 200 клітин/мкл.

4. Профіль цитокинів знаходиться у взаємодії з рівнем імунокомпетентних клітин, про що свідчить наявність кореляційних зв'язків між сироватковою концентрацією *IL-10* і *TNF- α* та числом Т-хелперів.

5. Виражені зміни рівня *IL-10* у пацієнтів на пізніх стадіях недуги та кореляційні зв'язки з індексом опортуністичних інфекцій і тяжкістю загального стану вказують на активне залучення даного цитокину в імунопатогенез ВІЛ-інфекції.

Таким чином, визначення рівнів цитокинів *IL-10* і *TNF- α* може бути розглянуто як додаткові прогностичні маркери прогресування ВІЛ-інфекції, а проведені імунологічні дослідження вказують на необхідність подальшого вивчення цитокинового ланцюга задля з'ясування патогенетичних зв'язків міжклітинної взаємодії при прогресивному перебігу захворювання та потенціалу використання інтерлейкінів у терапевтичних цілях.

Література

1. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010 [електронний ресурс] / UNAIDS // WHO Library. – 2010.

– 364 p. – Режим доступу: <http://www.unaids.org/globalreport/>

2. Cytokine profiles in HIV-1 subtype infected individuals with different rates of diseases progression: a multiplex immunoassay / [T. Chuenchitra, P. Chaitaveep, S. Sukwit et al.] // J. Med. Ass. Thailand. – 2012. – Vol. 134, N 5. – P. 116-123.

3. Segal J.L. A Novel Immunogen to Modulate Cytokine Production and Promote Immune System Reconstitution in HIV-AIDS / J.L. Segal, J.F. Thompson, R.A. Charter // Am. J. Ther. – 2012. – Vol. 19, N 5. – P. 317-323.

4. TH1/TH2 cytokine levels as an indicator for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection and response to antiretroviral therapy / [C.E. Osakwe, C. Bleotu, M.C. Chifiriuc et al.] // Roum. Arch. Microbiol. Immunol. – 2010. – Vol. 69, N 1. – P. 24-34.

5. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin / [J. Lajoie, J. Poudrier, M. Massinga-Loembe et al.] // Mucosal Immunol. – 2008. – Vol. 1, N 4. – P. 309-316.

6. Functional state of CD4+ and CD8+ T lymphocytes and their role in the slow progression of HIV infection in pediatric patients / [M.A. Alfonso, A. Diaz, L. Siciliano et al.] // J. Pediatr. (Rio J.). – 2012. – Vol. 88, N 2. – P. 161-168.

7. Relationship between levels of inflammatory cytokines in the genital tract and CD4+ cell counts in women with acute HIV-1 infection / [L.M. Bebell, J.A. Passmore, C. Williamson et al.] // Infect. Dis. – 2008. – Vol. 198, N 5. – P. 710-714.

8. Associations of proinflammatory cytokine levels with lipid profiles, growth, and body composition in HIV-infected children initiating or changing antiretroviral therapy / [J.S. Cervia, C.J. Chantry, M.D. Hughes et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2010. – Vol. 29, N 12. – P. 1118-1122.

9. Kwon D.S. Protective and detrimental roles of IL-10 in HIV pathogenesis / D.S. Kwon, D.E. Kaufmann // Eur. Cytokine Netw. – 2010. – Vol. 21, N 3. – P. 208-214.

10. Identification of three immunologic correlates for HIV type 1 pathogenesis in youth / [W. Song, Y. Li, C.M. Wilson et al.] // AIDS Res. Hum. Retroviruses. – 2011. – Vol. 27, N 6. – P. 639-646.

11. Association of interleukin 4 VNTR polymorphism and HIV/AIDS in a north Indian seropositive patients / [R.C. Sobti, N. Berhane, S.A. Mahdi et al.] // Mol. Biol. Rep. – 2012. – Vol. 39, N 3. – P. 3251-3257.

12. Host Factor Transcriptional Regulation Contributes to Preferential Expression of HIV Type 1 in IL-4-Producing CD4 T Cells / [M. Zhang, A. Clausell, T. Robinson et al.] // J. Immunol. – 2012. – Vol. 189, N 6. – P. 2746-2757.

13. Abnormal Immune Responses in Persons with Previous Extrapulmonary Tuberculosis in an In Vitro Model That Simulates In Vivo Infection with Mycobacterium tuberculosis / [C.T. Fiske, A.S. de Almeida, A.K. Shintani et al.] // Clin. Vaccine Immunol. – 2012. – Vol. 19, N 8. – P. 1142-1149.

14. Type 1/type 2 cytokine modulation of T-cell programmed cell death as a model for human immunodeficiency virus pathogenesis / [M. Clerici, A. Sarin, R.L. Coffman et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – N 91. – P. 1181.

15. In vitro restoration of T cell immune function in human immunodeficiency virus-positive persons: effects of interleukin (IL)-12 and anti-IL-10 / [A.L. Landay, M. Clerici M, F. Hashemi et al.] // J. Infect. Dis. – 2006. – N 173. – P. 1185.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

IMMUNOLOGICAL CHANGES AND CYTOKINES PROFILE IN PATIENTS WITH HIV-INFECTION

A.I. Piddubna, M.D. Chemych

SUMMARY. The article presents the analysis of the profile of cytokines IL-4, IL-10, TNF- α and features of the disease in HIV-infected persons, depending on the level of immunosuppression. Established that the

immune status of patients with HIV individuals is characterized by failure of cell compartment with an imbalance ratio of immune cells and increased production of proinflammatory TNF- α and anti-inflammatory IL-10.

Key words: HIV-infection, cytokines, cell immunity.

Отримано 7.11. 2012 р.

© Москалюк В.Д., Сорохан В.Д., Меленко С.Р., Баланюк І.В., 2013
УДК 616.98:578.829.6-06:616.98

V.D. Moskaliuk, V.D. Sorokhan, S.R. Melenko, I.V. Balaniuk

A SHIFT OF THE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION MARKERS IN PATIENTS WITH HIV-INFECTION/AIDS UNDER HAART

Bukovinian State Medical University

On the basis of inspection 127 patients with HIV-infection/AIDS it is set that at this pathology substantially grows concentration of thrombomodulin, and von Willebrand factor, which specifies on HIV-induced of vascular wall defeat. As far as progress of immunogenicity the concentration of all of the noted indexes grows for certain. 3-monthly symptomatic therapy does not influence on the state of endothelia.

Key words: endothelial dysfunction, HIV/AIDS.

Recently, special attention of scientists focused on the role of endothelium in the pathogenesis of HIV infection. Locally, the endothelium forms a wall of hepatic blood capillary – sinusoid to ensure exchange between blood and tissues. In general, endothelial lining of blood vessels of the body is seen as an active independent body that ensures homeostasis of the vascular wall and is an important barrier to the spread and development of infection [1, 2].

Molecules that are produced by endothelium and are markers of its activation and damage are in soluble form in the bloodstream [3]. They can identify qualitative and quantitative laboratory methods. In particular, highly sensitive tests are defined in the peripheral blood content of thrombomodulin and von Willebrand factor levels [4, 5].

Thrombomodulin is a surface glycoprotein of endotheliocytes that involved in the processes of blood coagulation and fibrinolysis [6]. In case of damage endothelial thrombomodulin released into the blood in soluble form, and its concentration in blood correlates with the degree of endothelial damage [7].

Von Willebrand factor is an adhesive glycoprotein which accumulates in the secretory granules of endothelial cells and subendothelial matrix. It regulates the initial adhesion of platelets to subendothelial and plasma levels of coagulation factor VIII. The level of von Willebrand factor in the blood increased by stimulation of endothelial cytokines and in case of it damaged [4].

The aim of the study was to study the content of these markers of endothelial dysfunction in blood of patients with HIV infection, they change depending on the clinical stage of disease and under HAART treatments.

Patients and methods

The study involved 127 patients with HIV infection who were on ambulatory treatment during 2008-2011 in a regional center for prevention and fight against AIDS of Chernivtsi. Among these patients were 66 men and 61 women aged 19 to 44 years.