



К.М. Горобченко, А.Г. Дьяченко, О.М. Савінова
Сумський державний університет

Помірна кореляція між розчинними маркерами мікробної транслокації та системного запалення при хронічній ВІЛ-інфекції

Мета роботи — визначення наявності та сили асоціації між маркерами мікробної транслокації, активізації моноцитів/макрофагів та системним запаленням при хронічній ВІЛ-інфекції.

Матеріали та методи. У дослідженні брали участь 78 ВІЛ-інфікованих пацієнтів. 61 — отримували антиретровірусну терапію, а решта — готувалися до неї. Контрольну групу склали 28 здорових донорів. Маркер мікробної транслокації (16S рДНК) визначали в плазмі крові за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, маркери системного запалення (sCD14, IL-6) — імуноферментним аналізом. Статистична обробка результатів проводилася за допомогою програми Statistica10.0.

Результати та обговорення. Встановлено, що рівень бактеріальної ДНК у плазмі ВІЛ-інфікованих осіб ($M \pm SD$) у кілька разів перевищує базовий рівень контролю — відповідно (769 ± 123) та (182 ± 40) копій/мкл. Протягом лікування рівень мікробної ДНК зменшується, але все ж таки залишається значно вищим від контрольного (542 копій/мкл ± 154 копій/мкл). Підвищуються також концентрації маркерів активізації макрофагів/моноцитів розчинного sCD14 та системного запалення IL-6. Встановлено позитивну кореляцію помірної сили між досліджуваними показниками.

Висновки. Помірна кореляція між маркерами мікробної транслокації, активізації моноцитів/макрофагів та системним запаленням свідчить про їхнє відносно незалежне походження або ж різні патогенетичні механізми розвитку.

Ключові слова

ВІЛ-інфекція, антиретровірусна терапія, мікробна транслокація, розчинні маркери транслокації.

З переходом ВІЛ-інфекції в хронічну фазу відбувається зниження рівня вірусного навантаження у плазмі та часткове відновлення кількості CD4 Т-клітин. Цей процес супроводжується хронічною активізацією імунної системи, внаслідок чого прискорюється обіг Т/В-лімфоцитів [8, 12] та підвищується рівень циркулюючих прозапальних цитокінів і хемокінів [17]. Доведено, що саме персистентна імунна активізація є головною детермінантою виснаження CD4 Т-лімфоцитів та потужним предиктором прогресії захворювання [5, 7, 9]. Нещодавно запропоновано патогенетичну модель розвитку хвороби, згідно з якою масова загибель CD4 Т-клітин

лімфоїдної тканини кишечника (особливо Th17-лімфоцитів) перманентно підвищує проникність мукозного бар'єра, що веде до транслокації таких мікробних продуктів, як ліпополісахарид (ЛПС), у системну циркуляцію з наступною хронічною активізацією імунної системи [2, 16]. ЛПС *in vivo* активізує рецептори CD14/TLR-4 макрофагів, що зумовлює секрецію розчинного CD14 (sCD14) і таких прозапальних цитокінів, як фактор некрозу пухлин (TNF- α), інтерлейкін-6, -1 (IL-6, -1) [11]. Доведено також, що ЛПС стимулює активізацію та смерть Т-лімфоцитів [6]. Хоча в літературі представлено результати багатьох досліджень бактеріальної транслокації та імунної активізації, більшість із них присвячена етапам захворювання, які супроводжуються ускладненнями або опортуністичними інфекціями

ями [2, 4, 10, 15]. Натомість залишається багато запитань щодо оркестрованої взаємодії процесів мікробної транслокації з активізацією імунної системи та хронічним запаленням, які є рушійною силою прогресії хронічної ВІЛ-інфекції. Одне з них стосується взаємодії мікробної транслокації та хронічної активізації імунної системи. Наявність тісної асоціації між цими процесами спонукає до впровадження регулярного моніторингу розчинних ВІЛ-неспецифічних біомаркерів бактеріальної транслокації у хронічно інфікованих осіб.

Мета роботи — визначення рівнів маркерів бактеріальної транслокації (16S рДНК), імунної активізації (sCD14) та системного запалення (ІЛ-6) у ВІЛ-інфікованих АРТ-наївних пацієнтів та тих, що перебувають на комбінованій антиретровірусній терапії.

Матеріали та методи

78 ВІЛ-інфікованих пацієнтів, які перебувають на диспансерному обліку та медичному супроводженні в Сумському обласному центрі боротьби з ВІЛ/СНІДом, після ознайомлення з метою і планом дослідження дали письмову згоду на участь у ньому. У всіх була II–III стадія розвитку ВІЛ-інфекції, згідно з критеріями ВООЗ. Зразки крові ВІЛ-негативних осіб ($n = 28$) приблизно тієї самої вікової групи отримано від донорів крові.

Маркер бактеріальної транслокації (16S рДНК) визначали в плазмі крові за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Реакційна суміш з кінцевим об'ємом 20 мкл вміщувала 2 мкл $10 \times$ ПЛР-буфера (100 ммоль/л трис-НСІ, рН 8,3; 500 ммоль/л КСІ; 3,5 ммоль/л $MgCl_2$; по 0,2 ммоль/л дезоксинуклеозидтрифосфатів; 0,75 од. Тақ-полімерази; по 0,5 мкмоль/л прямої та зворотної затравки та 5 мкл, або приблизно 2 нг) ДНК плазми. Ми використовували дегенеративну пару праймерів: прямий (8F: 5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') та зворотний (515R: 5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'), де W = A або T, K = G або T, R = A або G [3, 10, 12].

Умови інкубації: реакційну суміш прогрівали при 95 °С 10 хв з подальшими 40 циклами при 95 °С — 10 с, 60 °С — 10 с та 72 °С — 22 с. ДНК ампліфікували у дублікатах і вираховували середнє значення. Кількість копій визначали за допомогою стандартної кривої серії розведень відомої плазмідної ДНК.

Розчинні маркери системного запалення sCD14 та ІЛ-6 визначали у плазмі крові за методом ІФА за допомогою наборів R&D Systems та Вектор-Бест відповідно.

Статистичний аналіз

Отримані результати кількісних ознак для осіб, які брали участь у дослідженні, а також для групи контролю наведені у вигляді середніх величин (M), середньоквадратичного відхилення ($\pm SD$), медіани (Me), верхніх і нижніх квантилів (інтерквартильний розмах, IQR; 25 % — 75 %) за умови ненормального розподілу даних. Нормальність розподілу кількісних ознак перевіряли за допомогою критерія Шапіро—Уїлка.

Порівняльний аналіз між групами ВІЛ-інфікованих та здорових осіб проводили з використанням U тесту Манна—Уїтні. Аналіз зв'язку між кількісними показниками було проведено за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Спірмена для непараметричних показників. Для порівняння двох безперервних рядів даних використовували t -критерій Стьюдента. Вважали, що критичний рівень статистичної значущості p дорівнює 0,05. Результати оброблено із застосуванням аналітичної та описової статистики за допомогою програми Statistica 10.0 (StatSoft Inc., USA, версія 10.0.1011.6), а також табличного редактора Microsoft Excel 2013.

Результати та обговорення

Досліджувані когорти та їхні клініко-демографічні дані

У дослідженні брали участь 78 ВІЛ-інфікованих пацієнтів, які були розподілені на три групи залежно від тривалості антиретровірусної терапії (АРТ): АРТ-наївні пацієнти ($n = 17$) та ті, яким АРТ проводили менше ($n = 8$) чи більше 6 міс ($n = 53$). Характеристики пацієнтів наведено в табл. 1. Кількість чоловіків та жінок в когорті була однаковою, медіана віку ВІЛ-інфікованих та інтерквартильний розмах ($Q_3 - Q_1$) становили 37 (37–36) років. Кількість $CD4^+$ -лімфоцитів у 1 мкл крові ВІЛ-інфікованих осіб (Me та IQR) дорівнювала 447 (687–271). Оскільки зниження рівня $CD4^+$ -лімфоцитів у крові понад 350 кл/мкл вважають в Україні стартовою точкою призначення АРТ, ми визначали також кількість пацієнтів відносно цього показника. На початок дослідження частка таких пацієнтів становила майже 36 %. У підгрупі АРТ-наївних осіб та тих, хто отримував АРТ незалежно від її тривалості, частка пацієнтів з кількістю $CD4^+$ -клітин менше 350 в 1 мкл становила приблизно третину підгруп.

При ВІЛ-інфекції порівняно з контролем значно підвищується рівень досліджуваних показників. Так, концентрація 16S рДНК, яка є маркером мікробної транслокації, зростає у 4,2 разу ($p < 0,05$), показники імунного подразнення

Таблиця 1. Демографічні характеристики ВІЛ-1-інфікованих осіб

Показник	ВІЛ-інфіковані (n = 78)	Отримують АРТ (n = 61)		АРТ (n = 17)
		АРТ < 6 міс (n = 8)	АРТ > 6 міс (n = 53)	
Стать, %				
жіноча	39 (50 %)	5	27	8
чоловіча	39 (50 %)	3	26	9
Вік, роки:				
M ± SD	35,5 ± 10,5	34 ± 9	35 ± 12	37 ± 8
Me (Q3 – Q1)	37 (43–30)	37 (39–28)	36 (43–31)	37 (43–33)
CD4 ⁺ , кл/мкл:				
M ± SD	516 ± 367	272 ± 172	546 ± 365	538 ± 408
Me (Q3–Q1)	447 (687–271)	240 (346–171)	472 (727–293)	514 (690–279)
< 350 кл/мкл (n = 28)	28 (36 %)	6	16	6
M ± SD	198 ± 104	196 ± 97	211 ± 95	168 ± 142
Me (Q3–Q1)	252 (275–91)	213 (247–119)	257 (275–135)	167 (273–46)
> 350мкл (n = 50)	50 (64 %)	2	37	11
M ± SD	694 ± 340		691 ± 343	739 ± 360
Me (Q3–Q1)	595 (761–475)		608 (837–444)	587 (727–516)

Таблиця 2. Розчинні маркери транслокації та системного запалення в плазмі крові ВІЛ-інфікованих осіб

Маркер	ВІЛ-інфіковані			Здоровий контроль
	АРТ-наївні	АРТ < 6 міс	АРТ > 6 міс	
16s рДНК, копій/мкл:				
M ± SD	769 ± 123	639 ± 93	542 ± 154	182 ± 40
Me (Q3 – Q1)	783 (848–678)	662 (716–570)	533 (626–438)	186 (205–144)
sCD14, мкг/мл:				
M ± SD	1,76 ± 0,15	1,43 ± 0,27	1,33 ± 0,28	0,39 ± 0,16
Me (Q3–Q1)	1,76 (1,89–1,65)	1,4 (1,56–1,22)	1,35 (1,51–1,19)	0,38 (0,45–0,29)
IL-6, пг/мл:				
M ± SD	1,58 ± 0,3	1,05 ± 0,32	0,92 ± 0,34	0,6 ± 0,31
Me (Q3–Q1)	1,72 (1,85–1,24)	1,1 (1,21–0,8)	0,81 (1,19–0,66)	0,64 (0,87–0,35)

(sCD14) та хронічного запалення (IL-6) збільшуються відповідно у 4,5 ($p < 0,01$) та 3,2 ($p > 0,05$) рази (рис. 1). Така тенденція спостерігається в усіх групах (табл. 2). Найвищі концентрації маркерів спостерігалися в когорті АРТ-наївних пацієнтів – $M \pm SD$: (769 ± 123) копій/мкл, (1,76 ± 0,15) мкг/мл та (1,58 ± 0,3) пг/мл відповідно. Протягом АРТ рівень маркерів транслокації та системного запалення знижується і в групі пацієнтів, які тривалий час (понад 6 міс) перебувають на АРТ, концентрація в крові 16S рДНК, sCD14 та IL-6 становить відповідно (542 ± 154) копій/мкл, (1,33 ± 0,28) мкг/мл та (0,92 ± 0,34) пг/мл. Середні значення та медіана усіх показників статистично значуще перевищували показники групи контролю (рис. 2).

Спостерігається позитивна кореляція між показником транслокації та sCD14 ($r = 0,3212$; $p = 0,0041$) і IL-6 ($r = 0,3336$; $p = 0,0028$) (рис. 3). Отриманий коефіцієнт, що визначає силу зв'язку, можна трактувати як помірний. Дещо більший коефіцієнт кореляції спостерігається між sCD14 та IL-6 ($r = 0,4005$; $p = 0,0003$).

Лише моношар епітеліальних клітин кишечника запобігає проникненню бактерій, які містяться в просвіті кишки, в циркуляцію. Збереженню внутрішнього гомеостазу допомагають різноманітні клітини лімфоїдної системи, до 80 % якої зосереджено в районі кишечника. Попри це, якась кількість мікроорганізмів (точніше, їхніх компонентів) постійно проникає крізь кишковий бар'єр, стимулюючи активізацію клітин-ефекторів імунної системи, перш за все моноцитів/макрофагів. Цей нормальний добре контрольований процес, відомий як транслокація, є обов'язковою складовою імунного гомеостазу. Мікробна транслокація спостерігається як у дорослих здорових осіб, так і у дітей, в яких вона помітніша [18]. Надмірне підвищення транслокації, яке супроводжує різні захворювання, призводить до хронічної імунної активізації та системного запалення. Одним з таких захворювань є ВІЛ-інфекція [1, 2, 13]. Причиною масивної транслокації при ВІЛ-інфекції є глибоке ураження лімфоїдної тканини кишечника вірусом імунодефіциту людини, що веде до катастро-

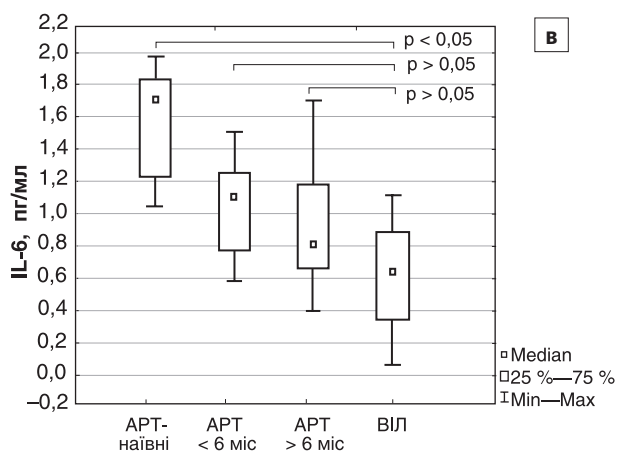
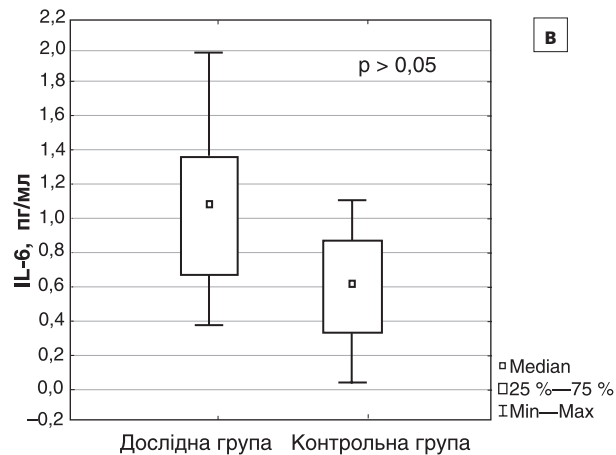
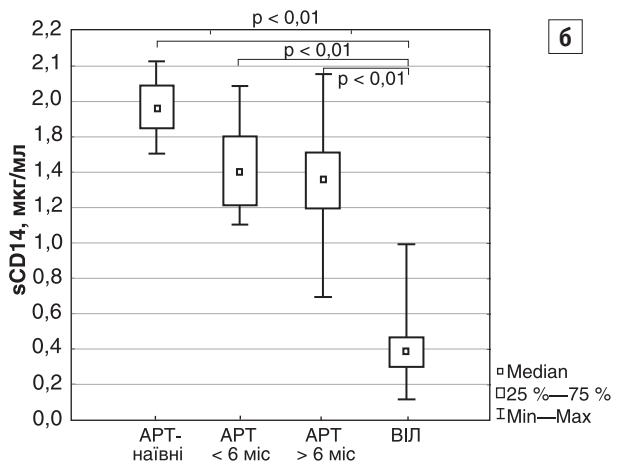
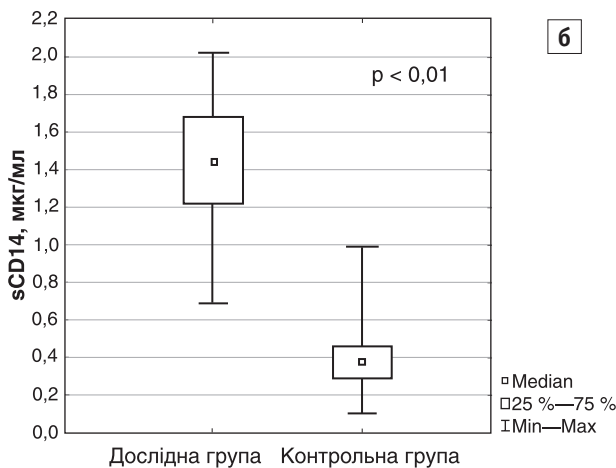
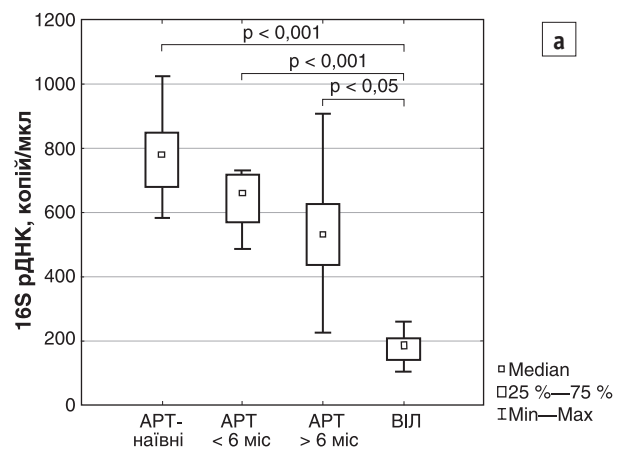
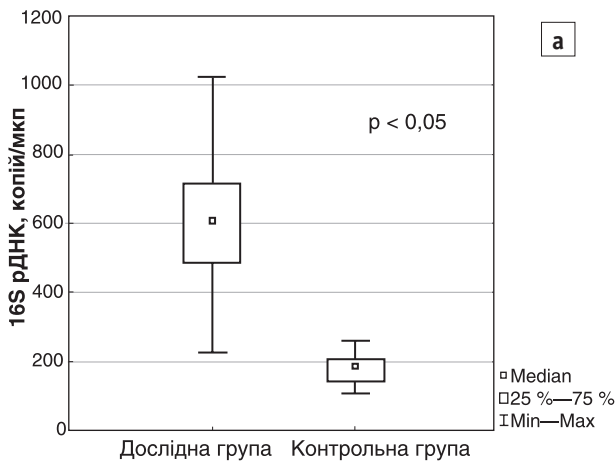


Рис. 1. Вміст бактеріальної 16S рДНК (а), розчинного рецептора CD14 (sCD14) (б) та інтерлейкіну 6 (IL-6) (в) у крові ВІЛ-інфікованих пацієнтів та здорових осіб

Рис. 2. Вплив антиретровірусної терапії на рівень у крові біомаркерів бактеріальної транслокації (а) та хронічного запалення (б, в)

фічного зменшення CD4⁺ Т-лімфоцитів, а також моноцитів/макрофагів [8]. А втім, розвиток мікробної транслокації супроводжується системним запаленням та активізацією моноцитів/макрофагів у певній кількості, але не у всіх ВІЛ-інфікованих осіб [14, 15]. У нашому дослідженні базальний рівень маркера мікробної транслокації 16S рДНК, виявлений у здорових волонтерів,

при хронічній ВІЛ-інфекції зростає у понад втричі ($p = 0,002$). Приблизно такий самий рівень зростання sCD14 ($p = 0,005$) та IL-6 ($p < 0,05$).

Мікробна транслокація (16S рДНК) демонструє досить помірну позитивну кореляцію з активізацією моноцитів/макрофагів (sCD14) ($r = 0,3212$; $p = 0,0041$) та системним запаленням

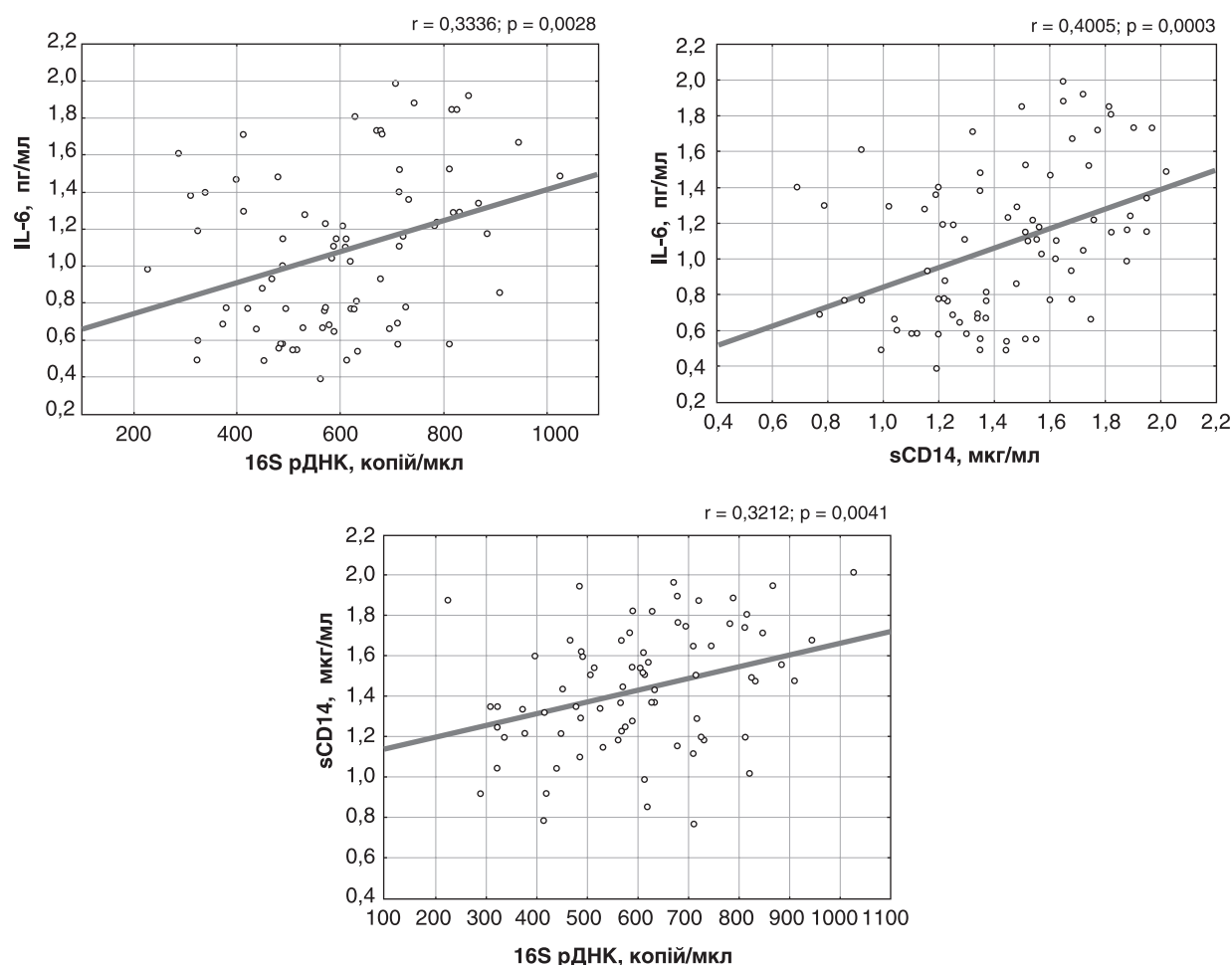


Рис. 3. Парний аналіз за Спірменом розчинних маркерів та хронічного запалення. Кореляційні коефіцієнти (r) наведено разом із відповідними значеннями p

(IL-6) ($r = 0,3336$; $p = 0,0028$). Трохи сильнішою є асоціація між показниками хронічної імунної відповіді, IL-6 та sCD14 ($r = 0,4005$; $p = 0,0003$). Ці результати свідчать, на наш погляд, про те, що мікробна транслокація відносно незалежна від активізації лімфоцитів.

Вказані процеси вносять свій вклад у виснаження CD4 Т-клітин при ВІЛ-інфекції, проте відбуваються вони скоріш за все відносно незалежно один від одного. Такий висновок підтверджується також тим фактом, що після призначення АРТ рівень маркерів транслокації та системного запалення знижується, водночас як частка осіб із кількістю CD4 Т-лімфоцитів, менша за 350 клітин/мкл, залишається сталою. Таким

чином, мікробна транслокація розвивається одночасно з мультилінійною активізацією лейкоцитів при ВІЛ-інфекції.

Висновки

1. При хронічній ВІЛ-інфекції спостерігається порушення цілісності слизової оболонки кишечника, що призводить до транслокації мікробних продуктів у циркуляцію.

2. Виявлено позитивну кореляцію помірної сили між маркерами мікробної транслокації (16S рДНК), активації моноцитів/макрофагів (sCD14) та системного запалення (IL-6), що вказує на прогностичне значення та роль в патогенезі ВІЛ-інфекції.

Список літератури

1. Appay V., Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences // *J. Pathol.*— 2008.— Vol. 214.— P. 231–241.
2. Brenchley J.M., Price D.A., Schacker T.W. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in

chronic HIV infection // *Nat. Med.*— 2006.— Vol. 12.— P. 1365–1371.

3. Brinig M.M., Lepp P.W., Ouverney C.C. et al. Prevalence of Bacteria of Division TM7 in Human Subgingival Plaque and Their Association with Disease // *Faculty Publications, Biological Sciences.*— 2003.— P. 1687–1694.— Doi 10.1128/AEM.69.3.1687-1694.

4. Cassol E., Malfeld S., Mahasha P. et al. Persistent microbial translocation and immune activation in HIV-1-infected South Africans receiving combination antiretroviral therapy // J. Infect. Dis.— 2010.— Vol. 202.— P. 723–733.
5. Deeks S.G., Kitchen C.M., Liu L. et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load // Blood.— 2004.— Vol. 104.— P. 942–947.
6. Funderburg N., Luciano A.A., Jiang W. et al. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death — a model for HIV pathogenesis. // PLoS One.— 2008.— Vol. 3.— P. e1915.
7. Giorgi J.V., Hultin L.E., McKeating J.A. et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage // J. Infect. Dis.— 1999.— Vol. 179.— P. 859–870.
8. Hellerstein M., Hanley M.B., Cesar D. et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans // Nat. Med.— 1999.— Vol. 5.— P. 83–89.
9. Hunt P.W., Martin J.N., Sinclair E. et al. T cell activation is associated with lower CD4⁺ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy // J. Infect. Dis.— 2003.— Vol. 187.— P. 1534–1543.
10. Jiang W., Lederman M.M., Hunt P. et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection // J. Infect. Dis.— 2009.— Vol. 199.— P. 1177–1185.
11. Kitchens R.L., Thompson P.A. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions // J. Endotoxin. Res.— 2005.— Vol. 11.— P. 225–229.
12. Lane H.C., Masur H., Edgar L.C. et al. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome // N. Engl. J. Med.— 1983.— Vol. 309.— P. 453–458.
13. Lien E., Aukrust P., Sundan A. et al. Elevated levels of serum-soluble CD14 in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection — correlation to disease progression and clinical events // Blood.— 1998.— Vol. 92.— P. 2084–2092.
14. Marchetti G., Bellistri G., Borghi E. et al. Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4⁺T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy // AIDS.— 2008.— Vol. 22.— P. 2035–2038.
15. Redd A.D., Dabito D., Bream J.H. et al. Microbial translocation, the innate cytokine response, and HIV-1 disease progression in Africa // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2009.— Vol. 106.— P. 6718–6723.
16. Sodora D.L., Silvestri G. HIV, mucosal tissues, and T helper 17 cells: where we come from, where we are, and where we go from here // Curr. Opin. HIV/AIDS.— 2010.— Vol. 5.— P. 111–113.
17. Valdez H., Lederman M.M. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection // AIDS Clin. Rev.— 1997–1998.— P. 187–228.
18. Wallet M.A., Rodriguez C.A., Yina L. et al. Microbial translocation induces persistent macrophage activation unrelated to HIV-1 levels or T-cell activation following therapy // AIDS.— 2010.— Vol. 24.— P. 1281–1290.

Е.Н. Горобченко, А.Г. Дьяченко, Е.М. Савинова
Сумський державний університет

Умеренная корреляция между растворимыми маркерами микробной транслокации и системного воспаления при хронической ВИЧ-инфекции

Цель работы — установление связи и силы ассоциации между маркерами микробной транслокации, активизации моноцитов/макрофагов и системным воспалением при хронической ВИЧ-инфекции.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 78 ВИЧ-инфицированных пациентов. 61 — получал антиретровирусную терапию, остальные — готовились к ней. Контрольную группу составили 28 здоровых доноров. Маркер микробной транслокации (16S рДНК) определяли в плазме крови с помощью полимеразной цепной реакции, маркеры системного воспаления (sCD14, IL-6) — иммуноферментным анализом. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 10.0.

Результаты и обсуждение. Установлено, что уровень бактериальной ДНК в плазме ВИЧ-инфицированных лиц ($M \pm SD$) в несколько раз превышает базовый уровень контроля — соответственно (769 ± 123) и (182 ± 40) копий/мкл. В ходе лечения уровень микробной ДНК уменьшается, хотя и остается значительно выше контроля (542 копий/мкл ± 154 копий/мкл). Повышаются также концентрации маркеров активизации макрофагов/моноцитов растворимого sCD14 и системного воспаления IL-6. Установлена позитивная корреляция умеренной силы между изучаемыми показателями.

Выводы. Умеренная корреляция между маркерами микробной транслокации, активизации моноцитов/макрофагов и системного воспаления свидетельствует о том, что эти процессы имеют относительно независимое происхождение или разные патогенетические механизмы развития.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, антиретровирусная терапия, микробная транслокация, растворимые маркеры транслокации.

K.M. Gorobchenko, A.G. Dyachenko, O.M. Savinova
Sumy State University, Sumy, Ukraine

Moderate correlation between the soluble markers of microbial translocation and system inflammation in the chronic HIV infection

Objective – our goal was to assess the correlation between markers of microbial translocation, monocyte/macrophage activation and system inflammation in chronic HIV infection.

Materials and methods. The study involved 78 HIV-infected patients, 61 – were receiving antiretroviral therapy (ART), the rest – were preparing for it. Control group consisted of 28 healthy donors. Marker of microbial translocation (16S rDNA) was determined in plasma by polymerase chain reaction (PCR), markers of systemic inflammation (sCD14, IL-6) – linked immunosorbent assay (ELISA). Statistical analysis was performed using the program Statistica 10.0.

Results and discussion. It was shown the bacterial DNA level in plasma of HIV-infected patients ($M \pm SD$) at the several time more than control base level ((769 ± 123) and (182 ± 40) copies/mL). There were also increased concentrations of soluble activation macrophage/monocytes marker sCD14 and system inflammation marker IL-6. There was positive moderate correlation between the analyzed indicators.

Conclusions. The moderate correlation between the studied indicators means the processes translocation, monocyte/macrophage activation and system inflammation have relatively independent origins or various pathogenic development pathways.

Key words: HIV infection, antiretrovirus therapy, microbial translocation, soluble translocation markers.

Контактна інформація:

Горобченко Катерина Миколаївна, аспірант кафедри гігієни та екології з курсом мікробіології, вірусології та імунології
Медичного інституту СумДУ
40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31
E-mail: horobchenko2013@yandex.ru

Стаття надійшла до редакції 4 серпня 2015 р.