

ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИОННЫХ РАБОТ

УДК 616.98-036.1

Г.Р. ХАСАНОВА^{1,2}, В.А. АНОХИН¹, Ф.И. НАГИМОВА²¹Казанский государственный медицинский университет, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49²Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ МЗ РТ, 420097, г. Казань, ул. Вишневого, д. 2а

Значение уровня растворимого рецептора CD14 для прогноза прогрессирования ВИЧ-инфекции

Хасанова Гульшат Рашатовна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры детских инфекций, врач-инфекционист РЦ по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ МЗ РТ, тел. (843) 267-80-06, e-mail: gulshatra@mail.ru^{1,2}

Анохин Владимир Алексеевич — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой детских инфекций, тел. (843) 267-81-00, e-mail: anokhin56@mail.ru¹

Нагимова Фирия Идиятулловна — кандидат медицинских наук, заместитель главного врача по медицинской части РЦ по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ, тел. (843) 236-94-36, e-mail: nagimova@list.ru²

Хроническая активация воспалительных реакций является важным фактором прогрессирования ВИЧ-инфекции. Одним из возможных стимуляторов воспалительной активности является эндотоксин грамотрицательных микроорганизмов. Целью исследования явилась оценка прогностической значимости уровня растворимого рецептора sCD14 (sCD14) — маркера активации эффекторных клеток эндотоксином — в прогрессировании ВИЧ-инфекции. Проведено проспективное когортное исследование, в котором оценивалась динамика CD4+лимфоцитов. В зависимости от исходного уровня sCD14 ($\leq 2,94$ пг/мл и $> 2,94$ пг/мл) 89 пациентов были поделены на две группы. Выявлено повышение уровня sCD14 в динамике заболевания. Уровень sCD14 статистически значимо превышал показатели контрольной группы [2,95 пг/мл (95%ДИ 2,45-3,63) и 1,91 пг/мл (95%ДИ 1,67-2,22) соответственно; $p=0,00001$]. Установлена статистически значимая связь уровня sCD14 с маркерами воспаления: фактором некроза опухоли- α ($r=0,35$; $p=0,007$), количеством лейкоцитов периферической крови ($r=0,21$; $p=0,04$) и СОЭ ($r=0,27$; $p=0,013$). Установлена корреляция уровня sCD14 с показателями прогрессирования ВИЧ-инфекции — стадией заболевания ($r=0,41$; $p=0,00006$), наличием оппортунистических инфекций ($r=0,41$; $p=0,00006$), снижением уровня CD4-лимфоцитов ($r=-0,21$; $p=0,046$). Анализ результатов когортного исследования выявил, что высокие уровни sCD14 прогнозируют более быстрые темпы снижения уровня CD4+клеток у пациентов, не получающих антиретровирусную терапию, равно как и большую частоту «неответа» на терапию. Установленное значение уровня sCD14 для прогноза прогрессирования ВИЧ-инфекции подтверждает роль эндотоксина грамотрицательных бактерий и микробной транслокации в патогенезе заболевания.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, sCD14, эндотоксин, воспаление.

G.R. KHASANOVA^{1,2}, V.A. ANOKHIN¹, F.I. NAGIMOVA²¹Kazan State Medical University, 49 Butlerov St., Kazan, Russian Federation, 420012²Republican Center of AIDS and Infectious Diseases of Ministry of Healthcare of Tatarstan Republic, 2a Vishnevskogo St., Kazan, Russian Federation, 420097

Value of soluble CD14 for prognosis of progression of HIV-infection

Khasanova G.R. — Associated Professor of the Department of Pediatric Infectious Diseases, ID specialist, tel. (843) 267-80-06, e-mail: gulshatra@mail.ru¹

Anokhin V.A. — D. Med. Sc., Professor, Head of the Department of Pediatric Infectious Diseases, (843) 267-81-00, e-mail: anokhin56@mail.ru¹

Nagimova F.I. — Candidate of Medical Sciences, Vice-Head of the Center of AIDS and Infectious Diseases of Ministry of Health of Tatarstan Republic, tel. (843) 236-9436, e-mail: nagimova@list.ru²



Chronic activation of inflammation is an important cause of HIV-infection progression. Endotoxin of gram-negative micro organisms is one of the possible agents which cause systemic inflammation. The purpose of our research was to evaluate the prognostic value of sCD14 — the marker of endotoxin-induced activation of cells — in the HIV-infection progression. A prospective cohort study was done to assess dynamics of CD4+ cells. 89 patients were divided into 2 groups, depending on the level of sCD14 (≤ 2.94 or > 2.94 pg/ml). The increased level of sCD14 during the whole course of disease was detected. The level of sCD14 in HIV-group was higher than the level in control group [2.95 pg/ml (95%CI 2.45-3.63) and 1.91 pg/ml (95%CI 1.67-2.22) respectively, $p=0.00001$]. Correlations of sCD14 and markers of inflammation were found, such as: tumor necrosis factor- α ($r=0.35$; $p=0.007$), leucocytes number ($r=0.21$; $p=0.04$) and erythrocyte sedimentation rate ($r=0.27$; $p=0.013$). Correlation of sCD14 level with markers of progression of HIV-infection was detected, such as: stage of the disease ($r=0.41$; $p=0.00006$); presence of opportunistic infections ($r=0.41$; $p=0.00006$), decrease of CD4-cells ($r=-0.21$; $p=0.046$). The analysis of results of cohort study revealed that higher levels of sCD14 predict higher speed of depletion of CD4+cells in patients without antiretroviral treatment, as well as higher rate of «lack of response» to treatment. Prognostic value of sCD14 levels in HIV-infection progression confirms the role of endotoxin of gram-negative micro organisms and the value of microbial translocation in the HIV-infection pathogenesis.

Key words: HIV-infection, sCD14, endotoxin, inflammation.

В последние годы широко обсуждается роль хронического воспаления и гиперактивации иммунной системы в прогрессировании ВИЧ-инфекции. В качестве возможной причины активации воспалительных реакций рассматриваются различные факторы, в т.ч. «микробная транслокация» из кишечника, т.е. попадание в кровоток компонентов кишечных бактерий, в первую очередь эндотоксина — липополисахаридного компонента клеточной стенки грамотрицательных микроорганизмов (ЛПС) [1]. Микробной транслокации способствует характерное для ВИЧ-инфекции повреждение кишечной стенки, проявляющееся в гибели кишечных CD4+лимфоцитов и энтероцитов и разрушении межклеточных связей [2, 3]. Ранее нами была продемонстрирована также чрезвычайно высокая prevalence микробиотических нарушений у пациентов на всех стадиях ВИЧ-инфекции [4]. ЛПС является высокоактивным биологическим веществом. Взаимодействие его с толл-лайн рецепторами-4 клеток миелоидного ряда приводит к активации каскада воспалительных реакций [5]. Это сопровождается выбросом в кровь растворимого рецептора CD14 (sCD14), который можно рассматривать не только как маркер активации клеток эндотоксином [6], но и наряду с ЛПС и 16S-рибосомальной ДНК как маркер микробной транслокации [7].

Цель исследования — оценка прогностической значимости уровня sCD14 у больных ВИЧ-инфекцией.

Пациенты и методы

Исследуемую группу составили 89 взрослых ВИЧ-инфицированных пациентов, в т.ч. 2 человека — на второй стадии ВИЧ-инфекции, 30 — на третьей и 57 — на четвертой (в соответствии с клинической классификацией В.И. Покровского, 2001). У 46 пациентов в момент обследования или в анамнезе были отмечены клинические проявления различных оппортунистических инфекций (туберкулез, орофарингеальный и урогенитальный кандидоз, волосистая лейкоплакия языка, опоясывающий лишай). Контрольную группу составили 26 условно-здоровых добровольцев. После проведенного лабораторного обследования за больными осуществлялось наблюдение в течение 2 и более лет с оценкой клинического состояния и основных лабораторных показателей.

Использовались коммерческие иммуноферментные тест-системы для определения уров-

ня sCD14 в сыворотке крови (тест-система производства Hycult biotech, Human ELISA), концентрации фактора некроза опухоли- α (TNF- α) (тест-система Elisa-TNF- α , ЗАО «Вектор-бест») и интерлейкина- 1β (IL- 1β) (тест-система Elisa-IL-1-BETA, ЗАО «Вектор-бест»).

Анализ полученных данных проводился при помощи программ STATISTICA 6.0, табличного редактора Microsoft Excel 2007, Epiinfo. Сравнение количественных данных проводилось с использованием критерия Манна — Уитни; данные представлялись в виде медианы (Me) и 25-75% квартилей [25-75%]. Для оценки связи между количественными признаками применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена, между количественными и порядковыми данными — метод Кендал-Тау. Оценка результатов когортного исследования проведена с использованием четырехпольных таблиц, подсчета показателей относительного риска (RR) и 95% доверительных интервалов (95%ДИ). Критический уровень статистической значимости p при проведении всех разделов исследования считали равным 0,05.

Результаты

У 46 пациентов (52%) уровень sCD14 превышал максимальные показатели контрольной группы. В исследуемой группе Me концентрации sCD14 составила 2,95 пг/мл (95%ДИ 2,45-3,63); при этом показатели значимо превышали уровни группы контроля: Me — 1,91 пг/мл (95%ДИ 1,67-2,22) ($p=0,00001$). Эта тенденция прослеживается не только у больных на четвертой стадии, но и у пациентов на третьей (бессимптомной) стадии заболевания (уровень sCD14 составил 3,17 пг/мл [2,69-3,76] и 2,46 пг/мл [1,9-3,06] соответственно, $p<0,05$ при сравнении с контрольной группой); показатели больных на второй стадии не анализировались ввиду малочисленности выборки.

Установлена статистически значимая связь уровня sCD14 с показателями воспаления, такими как: TNF- α ($r=0,35$; $p=0,007$), количество лейкоцитов периферической крови ($r=0,21$; $p=0,04$) и СОЭ ($r=0,27$; $p=0,013$). Корреляции sCD14 с уровнем ИЛ- 1β не выявлено ($r=0,18$; $p=0,16$). Таким образом, продемонстрирован факт повышения уровня sCD14 параллельно с отдельными маркерами воспаления в течение всего заболевания, что подтверждает факт ЛПС-индуцированной активации воспалительных реакций у больных ВИЧ-инфекцией.

Таблица 1.
Корреляции sCD14 с клинико-лабораторными показателями прогрессирования ВИЧ-инфекции

Признак	Клиническая стадия заболевания	Наличие оппортунистических инфекций	CD4-лимфоциты/мкл	Вирусная нагрузка, log ₁₀
sCD14, пг/мл	r=0,41 p=0,00006	r=0,34 p=0,0007	r=-0,21 p=0,046	r=0,07 p=0,5

r — коэффициент корреляции; *p* — уровень статистической значимости

Таблица 2.
Показатели уровня sCD14 в зависимости от наличия оппортунистических инфекций

Наличие ОИ*	Абсолютное число пациентов (n)	Показатели sCD14 Ме [25%-75%]	p#	p [§]
Есть ОИ	46	3,13 [2,66-3,86]	0,0000001	0,0049
Нет ОИ	43	2,79 [2,07-3,03]	0,00012	
Контрольная группа	26	1,91 [1,67-2,22]	-	-

* — оппортунистические инфекции;

— достоверность различий с показателями контрольной группы;

§ — достоверность различий между группами

Таблица 3.
Характеристика групп пациентов

Показатель	Группа 1 (sCD14 ≤ 2,94 пг/мл) n=43	Группа 2 (sCD14 > 2,94 пг/мл) n=46	P
Пол (мужчины / женщины)	18/25	19/27	>0,05
Стадия заболевания			
2-я	2	-	-
3-я	21 (48,8)	9 (19,6%)	0,005
4-я	20 (46,5)	37 (80,4)	0,001
Наличие оппортунистических инфекций	3 (7%)	10 (21,7%)	0,05
Уровень CD4, Ме (ДИ25-75%)	265,5 [199-486,5]	193,5 (121-312)	0,03
Lg «вирусной нагрузки», Ме (ДИ25-75%)	2,43 (2,3-2,7)	2,28 (2,08-2,49)	>0,05
Получают АРВТ,* в т.ч. схемы, содержащие ингибиторы протеаз	21	20	>0,05
схемы, содержащие ННИОТ**	11	10	
схемы, содержащие 3 НИОТ***	9	9	
	1	1	

P — статистическая значимость различий между группами;

* — учитывались больные, получающие АРВТ (антиретровирусную терапию) в течение 2 и более лет;

** — ННИОТ — нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы;

*** — НИОТ — нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

Связь уровня sCD14 с клиническими и лабораторными признаками иммуносупрессии представлена в табл. 1. Из приведенных данных видно, что уровни sCD14 положительно связаны с клинической стадией заболевания и с наличием оппортунистических инфекций и обратно коррелируют с уровнем CD4-лимфоцитов. Показатели sCD14 в группе больных на 4-й стадии заболевания статистически значимо превышают показатели пациентов, находящихся на третьей стадии заболевания ($p=0,0004$). Аналогична ситуация

по оппортунистическим инфекциям: в группе пациентов с оппортунистическими заболеваниями уровень показателя sCD14 значимо превышает значения данного показателя в группе пациентов без оппортунистических инфекций (см. табл. 2).

Для дальнейшего анализа все больные были разделены на две группы в зависимости от исходного количества sCD14. В первую группу были отнесены пациенты с уровнем sCD14 ≤ 2,94 пг/мл («пороговый», максимальный показатель контрольной группы), во вторую группу — пациенты



Таблица 4.
Показатели отношения рисков в группах пациентов в зависимости от наличия потенциальных мешающих факторов

Группы пациентов	RR	Взвешенный RR по Мантелю — Хензелю
Стадии заболевания: третья; n=13 четвертая; n=5	8,13 7,3	8,14
Уровень CD4+ клеток: <350 в 1 мкл; n=6 ≥350 в 1 мкл; n=12	1,79 1,86	7,76

с уровнем sCD14 > 2,94 пг/мл. Сравнительная характеристика групп больных представлена в табл. 3. Из таблицы видно, что сравниваемые группы различались по стадиям заболевания, уровню CD4-клеток, наличию оппортунистических инфекций. Наблюдались в течение 2 лет 65 человек из 89, изначально включенных в исследование, 24 человека выбыли из когорты: 9 — умерли, 1 — сменил место жительства, 14 человек не прошли лабораторного обследования через два года после начала исследования.

Из 65 пациентов 18 больным (11 больным — из первой группы, 7 — из второй) антиретровирусная терапия (АРВТ) в течение всего периода наблюдения не была назначена, т.е. эта группа пациентов рассматривалась как группа с естественным течением заболевания, что позволило провести анализ снижения CD4-клеток в зависимости от исходного содержания sCD14-белка. В качестве пограничного показателя, отражающего темпы прогрессирования иммуносупрессии, выбрано снижение CD4+ клеток на 50 клеток в год (т.е. на 100 клеток за 2 года). Пациенты с темпами снижения уровня CD4+ клеток более чем на 100 клеток в 1 мкл в год, условно отнесены нами к «быстрым прогрессорам», менее 100 клеток в 1 мкл в год — к «медленным прогрессорам».

RR «быстрого» прогрессирования заболевания составил 7,86 (95%ДИ 1,14-53,94). В качестве вмешивающихся факторов и конфаундеров рассматривались уровень CD4-клеток и стадия заболевания (табл. 4). Оппортунистические заболевания в момент начала исследования у данной группы больных не регистрировались. В результате анализа было установлено, что указанные факторы не являлись модификаторами эффекта или конфаундерами. Соответственно, мы можем заключить, что ВИЧ-инфицированные пациенты без терапии с уровнем sCD14 более 2,94 пг/мл, независимо от стадии заболевания и исходного уровня CD4+клеток, имеют значительно больший риск прогрессирования иммуносупрессии, нежели пациенты с меньшим уровнем sCD14.

Проведена оценка иммунологической эффективности АРВТ у больных, получавших ее в течение 2 лет наблюдения. В качестве маркера иммунологической эффективности терапии использовано повышение уровня CD4+лимфоцитов более чем на 50 клеток в 1 мкл в год (т.е. на 100 клеток в 1 мкл за 2 года); соответственно, отсутствие прироста клеток более чем на 100 в 1 мкл за 2 года лечения расценивалось как иммунологическая неэффективность терапии. Показатель RR «неответа» на АРВТ составил 2,52 (95% ДИ 1,08-5,86) — пациенты с относительно высокими уровнями sCD14 имеют больший риск иммунологической неэффективности терапии.

Обсуждение

Феномен гиперактивации иммунной системы с последующим ее истощением рассматривается сегодня многими исследователями как один из ключевых в патогенезе иммунодефицита при ВИЧ-инфекции [1, 8]. Определенную роль в этом процессе может играть микробная транслокация с повышением концентрации в крови биологически активных веществ, в особенности эндотоксина [1]. Многие работы подтверждают факт повышения концентрации эндотоксина плазмы и, соответственно, наличие феномена микробной транслокации у пациентов на разных стадиях ВИЧ-инфекции [1, 8, 9]. Продемонстрированное в нашем исследовании повышение уровней sCD14 у больных ВИЧ-инфекцией, коррелирующее с уровнями отдельных маркеров воспаления, подтверждает обыденность эндотоксин-опосредованного воспаления у ВИЧ-инфицированных пациентов. Причем выраженность повышения уровня sCD14, который можно рассматривать как маркер «результативной» эндотоксинемии, коррелирует со стадией заболевания и с клиническими, равно как и лабораторными маркерами иммуносупрессии в поперечном исследовании, а также определяет темпы снижения CD4+клеток при динамичном наблюдении за пациентами. Использование АРВТ, несомненно, оказывает кардинальное влияние на течение и прогноз заболевания, однако она, по мнению ряда авторов, лишь частично восстанавливает барьерные функции желудочно-кишечного тракта [1, 8]. Продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных людей остается меньше таковой в популяции. Основными причинами смерти людей с ВИЧ-инфекцией в регионах с доступной АРВТ на сегодняшний день являются опухоли, традиционно не ассоциируемые с ВИЧ-инфекцией (например, рак мочевого пузыря, печени, прямой кишки, лимфома Ходжкина) [10], а также заболевания, в основе которых лежит эндотелиальная дисфункция, которая также должна рассматриваться как исход хронического воспаления (кардиоваскулярные заболевания, ОНМК, ВИЧ-деменция) [9]. Помимо этого продолжающееся воспаление может быть причиной иммунологической неэффективности терапии и прогрессирования иммунодефицита у отдельных больных даже на фоне АРВТ.

Таким образом, установлена прогностическая значимость уровня sCD14 для прогрессирования ВИЧ-инфекции, что подтверждает роль эндотоксина грамотрицательных бактерий и микробной транслокации в патогенезе заболевания. Продолжение исследований в данном направлении позволило бы разработать методы патогенетической терапии ВИЧ-инфекции, направленные на сдерживание микробной транслокации и уменьшение активности воспалительных реакций и, соответственно, улучшение прогноза заболевания у больных с ВИЧ-инфекцией.



ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Li Q., Estes J.D., Duan L. et al. Simian immunodeficiency virus-induced intestinal cell apoptosis is the underlying mechanism of the regenerative enteropathy of early infection // *J Infect Dis.* — 2008. — Vol. 197. — P. 420-429.
3. Brenchley J.M., Price D.A., Douek D.C. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? // *Nat Immunol.* — 2006. — Vol. 7. — P. 235-239.
4. Хасанова Г.Р., Анохин В.А., Биккинина О.И. и др. Нарушения микробиоценоза кишечника у больных ВИЧ-инфекцией // *Казанский медицинский журнал.* — 2013. — Т. 94, № 1. — С. 34-39.
5. Gioannini T.L., Weiss J.P. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells // *Immunol Res.* — 2007. — Vol. 39. — P. 249-260.
6. Hiki N., Berger D., Prigl C. et al. Endotoxin binding and elimination by monocytes: secretion of soluble CD14 represents an inducible mechanism counteracting reduced expression of membrane CD14 in patients with sepsis and in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria // *Infect Immun.* — 1998. — Vol. 66. — P. 1135-1141.
7. Sandler N.G., Wand H., Roque A. et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV-infection // *J Infect Dis.* — 2011. — Vol. 203 (6). — P. 780-790.
8. Marchetti G., Bellistri G.M. 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.
9. 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.
10. Clifford G.M., Franceschi S. Cancer risk in HIV-infected persons: influence of CD4+ count // *Future Oncol.* — 2009. — Vol. 5. — P. 669-678.

УВАЖАЕМЫЕ АВТОРЫ!

Перед тем как отправить статью в редакцию журнала «Практическая медицина», проверьте:

- Направляете ли Вы отсканированное рекомендательное письмо учреждения, заверенное ответственным лицом (проректор, зав. кафедрой, научный руководитель), отсканированный лицензионный договор.
- Резюме не менее 6–8 строк на русском и английском языках должно отражать, что сделано и полученные результаты, но не актуальность проблемы.
- Рисунки должны быть черно-белыми, цифры и текст на рисунках не менее 12-го кегля, в таблицах не должны дублироваться данные, приводимые в тексте статьи. Число таблиц не должно превышать пяти, таблицы должны содержать не более 5–6 столбцов.
- Цитирование литературных источников в статье и оформление списка литературы должно соответствовать требованиям редакции: список литературы составляется **в порядке цитирования источников**, но не по алфавиту.

Журнал «Практическая медицина» включен Президиумом ВАК в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.