

## СИСТЕМНЫЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ И ПРОГРЕССИРОВАНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

**ГУЛЬШАТ РАШАТОВНА ХАСАНОВА**, канд. мед. наук, доц. кафедры детских инфекций, ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, врач-инфекционист Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД, Казань, Россия, тел. (843)267-80-06, e-mail: gulshatra@mail.ru

**ОЛЕСЯ ИЛЬМИРОВНА БИККИНИНА**, аспирант кафедры детских инфекций ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, врач-инфекционист Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД, Казань, Россия, тел. (843)238-17-43, e-mail: ofelia4@yandex.ru

**ЛИЛИЯ БУЛАТОВНА АКЧУРИНА**, аспирант кафедры детских инфекций ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, врач-инфекционист Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД, Казань, Россия, тел. (843)238-17-43, e-mail: chulpan190885@mail.ru

**ВЛАДИМИР АЛЕКСЕЕВИЧ АНОХИН**, докт. мед. наук, проф., зав. кафедрой детских инфекций ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Россия, тел. (843)267-80-00, e-mail: anokhin56@mail.ru;

**ИЛЬДУС ИЛЬЯСОВИЧ АХМЕТОВ**, докт. мед. наук, зав. лабораторией молекулярной генетики ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Россия, e-mail: genoterra@mail.ru

**Реферат.** Цель — оценить роль эндотоксина грамотрицательных бактерий в процессе гиперактивации иммунной системы и прогрессирования заболевания и выявление возможного влияния полиморфизмов гена TLR4 на прогрессирование ВИЧ-инфекции. **Материал и методы.** Проведено клиническое исследование 232 человек с установленным диагнозом «ВИЧ-инфекция» (48,3% мужчины). Контрольную группу составили 26 здоровых добровольцев в возрасте от 23 до 55 лет [ $M \pm SD = (30,6 \pm 11,3)$  года]. Для оценки влияния полиморфизмов гена TLR4 на прогрессирование заболевания было проведено ретроспективное когортное исследование. Исследуемую группу составили 100 человек, у которых уровень  $CD_4^+$ -клеток в момент постановки диагноза ВИЧ-инфекции и начала диспансерного наблюдения в СПИД-центре был выше 350 в 1 мкл. Далее больные были поделены на 2 группы: в 1-ю группу вошли пациенты, у которых в течение 5 лет наблюдения уровень  $CD_4^+$ -клеток стабильно держался выше 350 клеток в 1 мкл. Во 2-ю группу вошли пациенты, у которых в течение 5 лет наблюдения отмечено снижение  $CD_4^+$ -клеток ниже 350. Контрольную группу для молекулярно-генетического анализа составили 100 здоровых добровольцев. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программ Portable Statistica 8 и Epiinfo. **Результаты.** В группе из 232 ВИЧ-инфицированных пациентов выявлено статистически значимое повышение уровня эндотоксина, растворимого белка sCD14, интерлейкина-1 $\beta$ , фактора некроза опухоли- $\alpha$ , C-реактивного белка. Установлен протективный эффект мутантного G-аллеля полиморфизма 896 A/G (299Asp>Gly) гена TLR4 в отношении прогрессирования заболевания у женщин. **Выводы.** Темпы прогрессирования ВИЧ-инфекции различны у отдельных больных. Важную роль в прогрессировании иммунодефицита играет гиперактивация иммунной системы.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, гиперактивация иммунной системы, полиморфизмы TLR4.

## SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE AND PROGRESSION OF HIV-INFECTION

**GULSHAT R. HASANOVA, OLESYA I. BIKKININA, LILIA B. AKCHURINA, VLADIMIR A. ANOKHIN, ILDUS I. AKHMETOV**

**Abstract.** *Objective.* To assess the role of endotoxin of gram-negative bacteria in the hyperactivation of the immune system and the progression of the disease and the identification of the possible impact of TLR4 gene polymorphisms on the progression of HIV infection. *Methods.* A clinical study of 232 people diagnosed with «HIV» (48,3% men) was performed. The control group consisted of 26 healthy volunteers aged 23 to 55 years ( $M \pm SD = 30,6 \pm 11,3$ ). A retrospective cohort study was performed to assess the impact of TLR4 gene polymorphisms on the progression of the disease. The study group included 100 people who were divided into 2 groups: Group 1 consisted of patients who have over 5 years of follow-level  $CD_4^+$  cells stably held above 350 cells in 1  $\mu$ L. The second group consisted of patients who have over 5 years of decreased  $CD_4^+$  cell counts below 350. The control group for the molecular genetic analysis consisted of 100 healthy volunteers. Statistical analysis of the data was performed using Portable Statistica 8 and Epiinfo. *Results.* In a group of 232 HIV-infected patients, a statistically significant increase in endotoxin sSD14 soluble protein, interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , C-reactive protein revealed. Demonstrated a protective effect of the mutant G-allele polymorphism 896 A/G (299Asp>Gly) gene TLR4 against disease progression in women. *Conclusion.* The rate of disease progression vary in individual patients. Immune hyperactivation plays an role in progression of the immunodeficit.

**Key words:** HIV-infection, hyperactivation of the immune system, TLR4 polymorphisms.

Уже в первые годы изучения эпидемии ВИЧ-инфекции было замечено, что у отдельных инфицированных людей (так называемых «нонпрогрессоров») заболевание прогрессирует медленно или не прогрессирует вовсе; таким пациентам удается безо всякого лечения поддерживать «нормальный» уровень CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток и соответственно избегать оппортунистических инфекций [1]. С появлением методов количественной детекции вируса стало очевидным, что часть больных может контролировать «вирусную нагрузку» на неопределяемом уровне в течение многих лет и в отсутствие антиретровирусной терапии (АРВТ). Эта категория больных получила название «элитные контроллеры» [2]. Чаще всего способность инфицированного человека контролировать «вирусную нагрузку» ассоциируется со стабильно высокими показателями CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток [3], однако и в этих случаях возможны исключения.

В 1988 г. Asher, Sheppard [4] и параллельно Grossman et al. [5] выдвинули гипотезу о решающей роли активации иммунной системы в патогенезе СПИДа. Согласно ей разрушение CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток является следствием не столько репликации в них вируса, сколько их предшествующей активации на фоне ВИЧ-инфекции. В настоящее время данная точка зрения поддерживается большинством исследователей, однако споры о том, что же вызывает гиперактивацию иммунной системы, продолжаются. В качестве одного из потенциальных активаторов иммунной системы рассматривается эндотоксин грамотрицательных бактерий, или липополисахарид (ЛПС). Следует отметить что результаты исследований по влиянию микробной транслокации и гиперэндотоксинемии на прогрессирование ВИЧ-инфекции, полученных в разных этнических группах людей, различаются между собой. В большинстве исследований, проведенных на североамериканском континенте, показана связь уровня ЛПС с гиперактивацией иммунной системы у ВИЧ-инфицированных людей [6, 7]. Итальянские исследователи (Troseid M. et al., 2010) выявили значимый параллельный рост концентрации ЛПС и HMGB1 (маркер тканевого некроза и иммунной активации) в крови больных ВИЧ-инфекцией, причем степень этого повышения имела расовые и этнические различия. Исследования, проведенные в Уганде, не выявили какой-либо ассоциации между уровнем циркулирующего ЛПС и скоростью прогрессирования ВИЧ-инфекции [8]. Все это позволяет предполагать возможную значимость дополнительных факторов, влияющих на активность ЛПС в организме, в том числе генетически детерминированных особенностей реагирования организма на антигенные воздействия. Своего рода ключевым моментом во взаимодействии эндотоксина с эффекторными клетками является его связывание с Toll-like-рецептором 4 (TLR4) — первым открытым рецептором врожденного иммунитета [9]. Связывание ЛПС с CD14/TLR4-рецепторами моноцитов (макрофагов) приводит к выбросу растворимых CD<sub>14</sub>-рецепторов (sCD14) и провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли, интерлейкин-1β, интерлейкин-6) с запуском всего каскада воспалительных реакций. Именно они, эти реакции, и лежат в основе гиперактивации иммунной системы при хронической ВИЧ-инфекции [6, 10].

Известно, что полиморфизмы генов, кодирующих белки клеток иммунной системы, изменяют ответ организма на микробные лиганды. Наиболее изученными и функционально значимыми полиморфизмами TLR4 являются два

несинонимичных однонуклеотидных полиморфизма. При первом полиморфизме Asp299Gly (896A/G) происходит замена аспарагиновой кислоты на глицин. При втором — Thr399Ile (1196C/T) меняется треонин на изолейцин. Данные N.C. Arbour et al. (2000) обеспечили первое генетическое доказательство, что мутации в гене TLR4 ассоциированы с различиями в реакции на ЛПС у людей. Они показали, что общая косегрегированная миссенс-мутация (Asp299Gly, 896A/G, rs4986790; и Thr399Ile 1196C/T, rs4986791), затрагивающая экстраклеточный домен TLR4, ассоциирована со сниженным ответом на вдыхаемый ЛПС у людей [11]. В исследованиях с моделированием экспериментальной эндотоксинемии у людей было установлено, что Asp299Gly вызывал снижение активности воспалительных реакций на поздней стадии воспаления (от 6 до 24 ч после внутривенного введения ЛПС) [12]. В то же время опубликованы результаты исследований, опровергающих клиническую значимость этих полиморфизмов [13].

Целью нашего исследования явилась оценка роли эндотоксина грамотрицательных бактерий в процессе гиперактивации иммунной системы и прогрессирования заболевания и выявление возможного влияния полиморфизмов гена TLR4 на прогрессирование ВИЧ-инфекции.

**Материал и методы.** Все исследования проведены на базе Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ (г. Казань) и на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет». Забор крови осуществлялся в амбулаторных условиях во время плановой диспансеризации пациентов.

Исследуемую группу составили 232 человека с установленным диагнозом «ВИЧ-инфекция». 48,3% из них были мужчины. Среднее содержание CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-лимфоцитов (M±SD) в исследуемой группе составило (286±215,1) кл/мкл. Из оппортунистических заболеваний регистрировались кандидоз (у 26,3% больных), туберкулез (у 15,5%), волосистая лейкоплакия языка (у 7,3% пациентов); 23,7% пациентов получали антиретровирусную терапию.

Контрольную группу составили 26 здоровых добровольцев в возрасте от 23 до 55 лет [M±SD=(30,6±11,3) года].

Для оценки влияния полиморфизмов гена TLR4 на прогрессирование заболевания нами было проведено ретроспективное когортное исследование. Исследуемую группу составили 100 человек, у которых уровень CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток в момент постановки диагноза ВИЧ-инфекции и начала диспансерного наблюдения в СПИД-центре был выше 350 в 1 мкл. Ни у одного из этих пациентов на тот момент оппортунистические инфекции не регистрировались. Далее больные были поделены на 2 группы: в 1-ю группу (условно названную нами «медленные прогрессоры») вошли пациенты, у которых в течение 5 лет наблюдения уровень CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток стабильно держался выше 350 клеток в 1 мкл. Обязательным условием для включения в данную группу было отсутствие получения АРВТ в течение 5 лет наблюдения. Во вторую группу (названную нами «быстрые прогрессоры») вошли пациенты, у которых в течение 5 лет наблюдения отмечено снижение CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток ниже 350. Части этих пациентов по клинико-лабораторным показаниям впоследствии была назначена АРВТ. Краткая характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1.

Характеристика исследуемых групп

Демографические и клинико-лабораторные характеристики пациентов	«Медленные прогрессоры», n=54	«Быстрые прогрессоры», n=46
Пол: мужчины женщины	36 (66,6%) 18 (33,3%)	24 (52%) 22 (48%)
Возраст, лет, M±SD	36±7,6	35±8
Среднее содержание CD <sub>4</sub> -лимфоцитов на момент начала наблюдения, кл/мкл, M±SD	654±144,2	611±265
Вирусная нагрузка на момент начала наблюдения, средний log копий/мл, M±SD	3,75±0,95	3,98±0,89

Контрольную группу для молекулярно-генетического анализа составили 100 здоровых добровольцев.

Определение ЛПС и маркеров воспаления. Концентрация ЛПС в сыворотке крови определялась с помощью ЛАЛ-теста (E-toxate, Sigma) в адаптированной к клиническим условиям модификации [14]. Для оценки концентрации ИЛ-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  использовали тест-системы для иммуноферментного анализа производства «Вектор-бест», sCD<sub>14</sub> — производства «HyCult biotech». Концентрация С-реактивного белка (СРБ) определена латексным иммунотурбидиметрическим тестом (тест-система HORIBA ABX) с использованием биохимического анализатора «Pentra400».

Генотипирование. Для молекулярно-генетического анализа использовали образцы ДНК испытуемых, выделенных сорбентным методом в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению к комплексу «ДНК-сорб-В» (ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ). Биологическим материалом служил соскоб эпителиальных клеток ротовой полости. Генотипирование осуществляли методом анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (Frosst et al., 1995).

Для определения 896A>G полиморфизма гена TLR4 использовали двухпраймерную систему (прямой праймер: 5'-AGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3'; обратный праймер: 5'-GAGAGATTTGAGTTTCAATGTGGG-3'). Ампликоны длиной 190 пар нуклеотидов (п.н.) обрабатывались эндонуклеазой рестрикции Bsp19I, «Сиб-Энзим». А-аллелю соответствовал фрагмент длиной 190 п.н., G-аллелю — фрагменты 168 п.н. и 22 п.н.

Для определения 1196C>T полиморфизма гена TLR4 использовали двухпраймерную систему (прямой праймер: 5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGA GAA-3'; обратный праймер: 5'-GGAAATCCAGATGTTCTAGTTGTTCTAAGCC-3'). Ампликоны длиной 124 пар нуклеотидов (п.н.) обрабатывались эндонуклеазой рестрикции Hinf I, «СибЭнзим». С-аллелю соответствовал фрагмент длиной 124 п.н., Т-аллелю — фрагменты 95 п.н. и 29 п.н.

Анализ длин рестриционных фрагментов продуктов при исследовании обоих полиморфизмов проводили путем электрофоретического разделения в 6% полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программ Portable Statistica 8 и Epiinfo. Для оценки связи между количественными признаками применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена, между количественными и качественными признаками — метод Кендал—Tau. Нормальность распределения количественного признака в вариационном ряду оценивалась с помощью

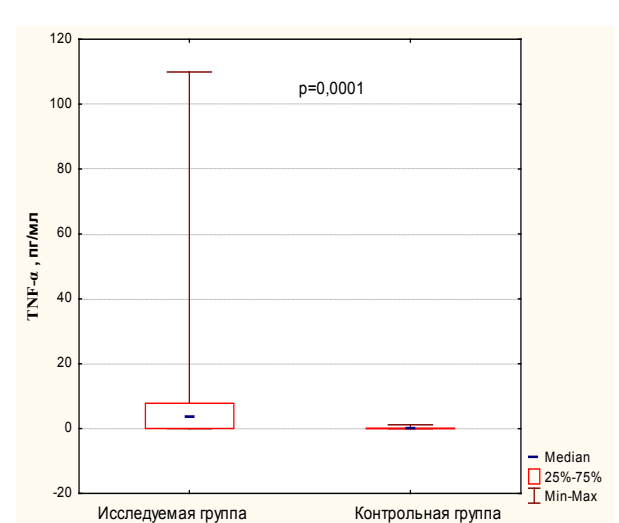
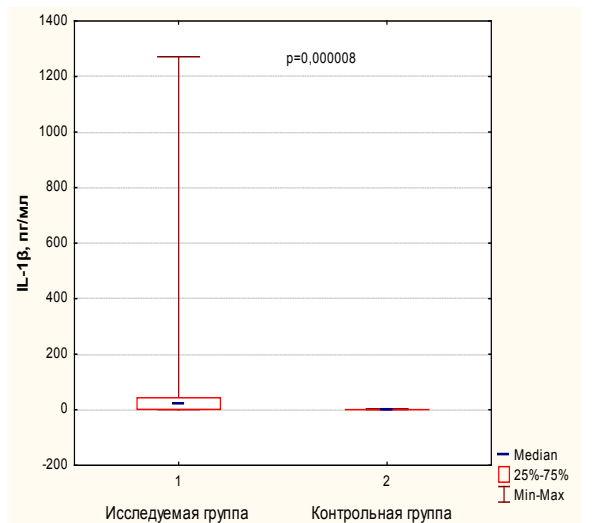
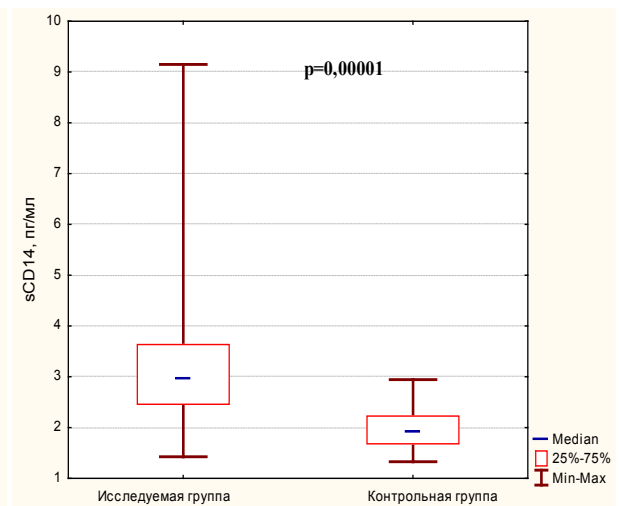
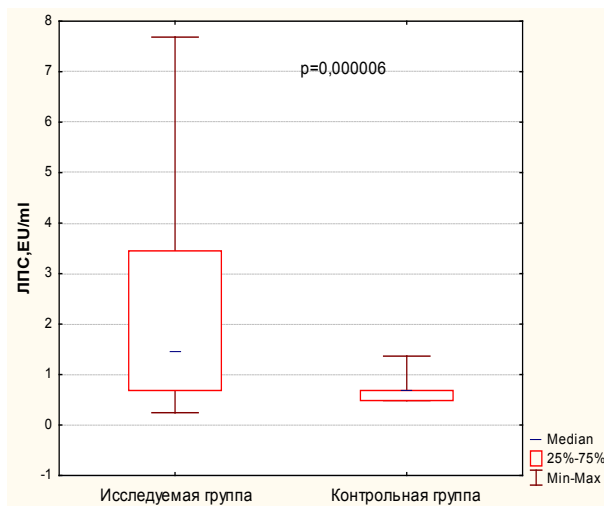
критерия Шапиро—Уилка. При сравнении двух непрерывных рядов данных использовали t-критерий Стьюдента. Значимость различий в частоте аллелей между сравниваемыми выборками определяли с использованием точного теста Фишера (для малых выборок). Для сравнения частот исходов высчитывались показатели «отношение шансов» (OR) и 95% доверительные интервалы. Для оценки возможной модификации эффекта и конфаундинга мы провели ранжирование группы по возрасту и полу с подсчетом взвешенного отношения шансов по Мантелю—Хензелю. Критический уровень статистической значимости *p* при проведении всех разделов исследования считали равным 0,05.

**Результаты их обсуждение.** У большинства пациентов с ВИЧ-инфекцией (52,2 и 91% соответственно) как концентрация ЛПС, так и концентрация sCD<sub>14</sub> превышали наибольшие показатели, зарегистрированные нами в группе здоровых. При разделении больных на группы по клиническим стадиям ВИЧ-инфекции (в соответствии с классификацией В.И. Покровского, 2001) и по стадиям иммуносупрессии (по классификации CDC) выявленная и статистически подтвержденная закономерность прослеживалась во всех группах пациентов. У значительной доли обследованных пациентов выявлены также сравнительно высокие показатели TNF- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и СРБ (у 34,3, 63,2 и 25,6% больных соответственно). Средние значения всех вышеназванных показателей статистически значимо превышали показатели контрольной группы (рисунки).

Из общей группы были выделены больные с нарушениями стула в течение длительного времени (неустойчивый стул, жидкий стул до 4 раз в день, запоры). Выявлена достоверная взаимосвязь нарушений стула и концентрации ЛПС в сыворотке крови ( $r=0,12$ ,  $p=0,009$ ); при этом средняя концентрация ЛПС в группе больных с нарушениями стула статистически значимо превышала таковую в группе без таковых нарушений ( $M\pm SD=2,93\pm 2,42$  и  $2,07\pm 1,91$  соответственно;  $p=0,04$ ).

Не выявлено зависимости концентрации эндотоксина сыворотки от стадии заболевания, выраженности иммуносупрессии и наличия оппортунистических инфекций, что подтверждает, на наш взгляд, универсальность феномена гиперэндотоксинемии при ВИЧ-инфекции. Выявленная взаимосвязь между нарушениями стула и эндотоксинемией, может в какой-то мере служить доказательством «кишечного» происхождения ЛПС.

Установлена связь уровня sCD<sub>14</sub> (маркера взаимодействия ЛПС с эффекторными клетками) с клиническими и лабораторными маркерами иммуносупрессии. Выявлена обратная корреляция показателей CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток и концентрации sCD<sub>14</sub> у обследованных больных ( $r=-0,21$ ;  $p=0,046$ ). Для более точной оценки



Показатели ЛПС, sCD14, IL-1β и TNF-α в исследуемой и контрольной группах

проведено поперечное срезовое исследование со сравнением превалентностей случаев снижения уровня CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-лимфоцитов ≤200 клеток/мкл в двух группах: с уровнем sCD<sub>14</sub> >2,44 пг/мл (максимальный показатель контрольной группы) и с уровнем sCD<sub>14</sub> ≤2,44 пг/мл. Отношение превалентностей (PR) составило 2,709; 95%ДИ — 1,087—6,791. При этом в группе пациентов с показателями sCD<sub>14</sub> ≤2,44 уровень CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток был значимо выше, чем у пациентов с более высокими показателями sCD<sub>14</sub> (379,3±212,5 и 258±179,8 соответственно;  $p=0,016$ ).

При разделении больных на группы в зависимости от наличия клинических признаков иммунодефицита (оппортунистических инфекций) также выявлена разница средних показателей sCD<sub>14</sub>: в группе пациентов с оппортунистическими заболеваниями уровень sCD<sub>14</sub> значимо превышал данный показатель пациентов без оппортунистических инфекций [(M±SD) 3,83±1,82 и 2,89±1,1 соответственно;  $p=0,0049$ ].

При проведении корреляционного анализа выявлены статистически значимые положительные связи эндотоксина с IL-1β ( $r=0,27$ ;  $p=0,0007$ ), sCD<sub>14</sub> с TNF-α ( $r=0,35$ ;  $p=0,007$ ), с количеством лейкоцитов крови ( $r=0,21$ ;  $p=0,04$ ), а также IL-1β с TNF-α ( $r=0,45$ ;  $p=0,00012$ ). Концентрация sCD<sub>14</sub> была также прямо пропорциональна уровню СРБ, СОЭ, температуре тела,

однако корреляционные связи не являлись статистически значимыми ( $r=0,16$ ;  $p=0,15$ ;  $r=0,19$ ;  $p=0,08$ ;  $r=0,08$ ;  $p=0,49$  соответственно).

В результате исследования полиморфизмов гена TLR4 получены следующие данные.

В контрольной группе генотипы по полиморфизму Asp299Gly (896A/G) распределились следующим образом: AA (87%), AG (13%) и GG (0%). Частота мутантного G-аллеля в контрольной выборке составила 6,5%. При анализе полиморфизма Thr399Ile (1196C/T) частота генотипа CC составила 87%, CT — 12%, TT — 1%. Частота мутантного T-аллеля в контрольной выборке составила 7%. Наблюдаемые распределения генотипов подчинялись равновесию Харди—Вайнберга [ $p=0,3641$ ;  $\chi^2=2,021$ ;  $df=2$  — для полиморфизма Asp299Gly (896A/G) и  $p=0,4931$ ;  $\chi^2=1,414$ ;  $df=2$  — для полиморфизма Thr399Ile (1196C/T)].

При анализе распределения частот генотипов и аллелей по полиморфизмам Asp299Gly (896A/G) и Thr399Ile (1196C/T) гена TLR4 в общей выборке ВИЧ-инфицированных ( $n=100$ ) были получены следующие результаты: наблюдаемое распределение генотипов AA (83%), AG (16%) и GG (1%) подчинялось равновесию Харди—Вайнберга ( $p=0,9314$ ;  $\chi^2=0,1420$ ;  $df=2$ ). Частота G-аллеля в группе больных составила 9%, статистически значимо не отличаясь от частоты в



контрольной группе ( $p=0,455$ ). Наблюдаемое распределение генотипов СС (84%), СТ (15%) и ТТ (1%) также подчинялось равновесию Харди—Вайнберга ( $p=0,6047$ ;  $\chi^2=1,006$ ;  $df=2$ ). Частота Т-аллеля в общей группе больных составила 8,5%. Частоты Т-аллеля в группе ВИЧ-инфицированных и в контрольной группе статистически значимо не различались ( $p=0,47$ ).

Анализ частоты мутантных аллелей в подгруппах больных с разными темпами прогрессирования ВИЧ-инфекции выявил статистически значимые различия в частоте G-аллеля: в группе «медленных прогрессоров» она составила 13%, в группе «быстрых прогрессоров» — 4,3% (OR 0,3; 95% ДИ 0,0967-0,9628). При анализе частоты мутантного Т-аллеля значимые различия не выявлены. В группе «медленных прогрессоров» она составила 11,1%, в группе «быстрых прогрессоров» — 5,4% (OR — 0,46; 95%ДИ — 0,1556—1,358).

Проведен анализ возможной ассоциации факторов риска (наличие гетерозиготного и гомозиготного по мутантному аллелю генотипа) с исходом. В нашем случае это снижение уровня  $CD_4^+$ -лимфоцитов ниже 350 в течение 5 лет (что соответствует условию включения в группу «быстрых прогрессоров») (табл. 2). Из представленных данных видно, что в группе с мутантным генотипом GA и GG по полиморфизму Asp299Gly (896A/G) частота быстрого прогрессирования заболевания значительно ниже, чем в группе с основным генотипом (AA)(OR — 0,3; 95%ДИ — 0,09—0,9976).

Таблица 2

**Частота «дикого» и мутантного генотипов гена TLR4 по полиморфизму 896A/G в группах с разными вариантами прогрессирования ВИЧ-инфекции**

	«Быстрые прогрессоры»	«Медленные прогрессоры»	Показатель абсолютного риска, %
GA+GG, n=17	4	13	23,5
AA, n=83	42	41	50,6
Всего	46	54	

Аналогичный анализ по полиморфизму Thr399Ile (1196C/T) не выявил влияния мутации СТ и ТТ на темпы прогрессирования заболевания (OR — 0,4767; 95%ДИ — 0,1524—1,491).

Ранжирование больных по возрасту и полу показало, что возраст не являлся конфаундером или модификатором эффекта ни по одному из исследуемых полиморфизмов, тогда как пол оказался сильным модификатором эффекта при анализе данных по полиморфизму 896 A/G (299Asp>Gly): OR для подгруппы мужчин составил 0,592; 95%ДИ — 0,137—2,560; для женщин — 0,095; 95%ДИ — 0,10—0,888. Таким образом, заключение о протективном эффекте мутантного G-аллеля в полиморфизме 896 A/G (299Asp>Gly) может быть сделано нами только в отношении женщин.

В связи с потенциальными возможностями разработки методов контроля ВИЧ-инфекции феномен медленного прогрессирования ВИЧ-инфекции у отдельных пациентов находится в поле пристального внимания исследователей.

Факторы, влияющие на прогноз клинического течения инфекции, могут быть связаны с особенностями вируса и особенностями организма хозяина. Показана, к примеру, роль таких «вирусных» факторов, как субтип ВИЧ-1 [15], биотипы вируса, определяющие тропизм вируса к хемокиновым рецепторам [16]. Что же каса-

ется факторов, связанных с организмом «хозяина», медленное прогрессирование заболевания ассоциировано, к примеру, с делецией 32-й пары оснований гена CCR5-рецептора [17]. Общеизвестным и доказанным является тот факт, что высокая «вирусная нагрузка» является основным промотором снижения  $CD_4^+$ -клеток и прогрессирования ВИЧ-инфекции [18]. На данном постулате базируется обоснование эффективности антиретровирусной терапии — единственного известного на сегодня эффективного метода контроля течения ВИЧ-инфекции. Тем не менее имеется достаточно подтверждений тому, что контроль репликации вируса не всегда ассоциируется с отсутствием клинического прогресса болезни. К примеру, при достаточно длительном наблюдении «элитные контроллеры» также демонстрируют снижение  $CD_4^+$ -клеток с развитием оппортунистических инфекций [19]. Помимо этого показана возможность «непрогрессирования» болезни, несмотря на высокий уровень репликации вируса [20]. Феномен гиперактивации иммунной системы с последующим ее истощением рассматривается сегодня многими исследователями как один из ключевых в патогенезе иммунодефицита при ВИЧ-инфекции [10, 21]. Классической иллюстрацией, подтверждающей эту точку зрения, можно считать, в частности, многочисленные наблюдения о сравнительно благополучном течении инфекции вируса иммунодефицита у низших приматов — дымчатых мангобеев, у которых очень высокая «вирусная нагрузка» при отсутствии признаков повышенной активности иммунной системы не приводит к значимому прогрессированию иммунодефицита в течение многих лет наблюдения [22]. В то же время хроническая стимуляция иммунной системы в эксперименте на мышах способствует развитию оппортунистических заболеваний даже в отсутствие вирусной инфекции [23]. Установленная в нашем исследовании обратная корреляция уровня  $sCD_{14}$  с клиническими и лабораторными признаками иммуносупрессии позволяет рассматривать эндотоксин в качестве одного из факторов, способствующих гиперактивации и «истощению» иммунной системы при ВИЧ-инфекции.

Проведенное нами исследование выявило высокий уровень как сывороточного ЛПС, так и  $sCD_{14}$ , количество которого, как уже указывалось, отражает результат взаимодействия эндотоксина с клетками миелоидного ряда. Кишечник, вне всякого сомнения, самый емкий резервуар грамотрицательной бактериальной флоры в организме, что, наряду с доказанным ранее фактом ВИЧ-индуцированного повреждения кишечного барьера [6], позволяет говорить о том, что регистрируемая в данном случае эндотоксинемия «кишечного» происхождения. В проведенных нами ранее исследованиях установлена чрезвычайно высокая частота дисбиотических изменений в кишечнике у пациентов с ВИЧ-инфекцией, что может также способствовать снижению колонизационной резистентности кишечника и микробной транслокации. Это подтверждается и выявленной нами связью частоты нарушения стула с гиперэндотоксинемией. Одновременно у пациентов, независимо от стадии их заболевания, регистрируются и высокие показатели уровня провоспалительных цитокинов, а также таких классических маркеров воспаления, как СРБ и СОЭ, подтверждающих выраженность системного воспалительного ответа, реализуемого, как известно, компонентами врожденного иммунитета. В отличие от данных, приводимых отдельными исследователями, мы не выявили статистически

значимых связей между концентрациями ЛПС и sCD<sub>14</sub>. Этот факт, по нашему мнению, может быть объяснен возможным связыванием ЛПС опсонинами, такими как антитела к ЛПС, липопротеиды высокой плотности и др., что может снижать биологическую активность эндотоксина. В то же время концентрация sCD<sub>14</sub> отражает «результативную» эндотоксинемию. Интересно, что для большинства оцениваемых нами показателей воспаления (TNF-α, СРБ, уровень лейкоцитов, СОЭ) зарегистрированы положительные корреляции именно с sCD<sub>14</sub>, а не с ЛПС.

Иначе говоря, результативность действия ЛПС на клетки миелоидного ряда, на наш взгляд, зависит не только от концентрации плазменного эндотоксина, но и от возможностей антиэндотоксиновых систем организма, которые могут кардинально различаться у отдельных больных, а также от генетически детерминированной восприимчивости TLR4 к эндотоксину. Полученные нами результаты исследования генетических полиморфизмов TLR4 четко демонстрируют протективный эффект мутантного генотипа 896A/G (299Asp>Gly) гена TLR4 в отношении прогрессирования заболевания в группе ВИЧ-инфицированных женщин. Это, в свою очередь, также подтверждает роль эндотоксинопосредованной активации иммунной системы в прогрессировании заболевания.

**Заключение.** ВИЧ-инфекция сопровождается гиперэндотоксинемией, ассоциированной с активацией воспалительных реакций в организме. Данный феномен является универсальным для ВИЧ-инфекции и, возможно, играет роль в прогрессировании заболевания, что подтверждается выявленной корреляцией между уровнем растворимого белка CD<sub>14</sub> (маркера активации моноцитов под действием эндотоксина) и лабораторными (снижение количества CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток), равно как и клиническими (наличие оппортунистических инфекций) признаками иммунодефицита. Мутантный генотип гена TLR4 по полиморфизму 896A/G (299Asp>Gly) ассоциирован с медленным прогрессированием заболевания у женщин. Полученные результаты позволяют рассматривать перспективы использования методов патогенетического лечения ВИЧ-инфекции, направленных на сдерживание избыточного поступления в кровотоки эндотоксина грамотрицательных бактерий и купирование системных воспалительных реакций. Исследование связи различных полиморфизмов гена TLR4 с активностью системных воспалительных реакций и прогрессированием ВИЧ-инфекции позволит прогнозировать прогрессирование заболевания у отдельных пациентов с максимальной индивидуализацией мероприятий по их диспансеризации и лечению.

## ЛИТЕРАТУРА

- Pantaleo, G.* Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection / G. Pantaleo, S. Menzo, M. Vaccarezza [et al.] // *New. Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 332, № 4. — P.209—216.
- Blankson, J.* Elite suppression of HIV-1 replication / J. Blankson, R. Siliciano // *Immunity.* — 2008. — Vol. 29, № 6. — P.845—847.
- Betts, M.R.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells / M.R. Betts, M.C. Nason, S.M. West [et al.] // *Blood.* — 2006. — Vol. 107, № 12. — P.4781—4789.
- Ascher, M.S.* AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis / M.S. Ascher, H.W. Sheppard // *Clin. Exp. Immunol.* — 1988. — Vol. 73, № 2. — P.165—167.
- Grossman, Z.* From HIV infection to AIDS: are the manifestations of effective immune resistance misinterpreted? / Z. Grossman, Z. Bentwich, R.B. Herverman // *Clin. Immunol. Immunopathol.* — 1993. — Vol. 69, № 2. — P.123—135.
- Brenchley, J.M.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection / J.M. Brenchley, D.A. Price, T.W. Schacker [et al.] // *Nat. Med.* — 2006. — Vol. 12, № 12. — P.1365—1371.
- Jiang, W.* Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection / W. Jiang, M.M. Lederman, P. Hunt [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 199, № 8. — P.1177—1185.
- Redd, A.D.* C-reactive protein levels increase during HIV-1 disease progression in Rakai, Uganda, despite the absence of microbial translocation / A.D. Redd, K.P. Eaton, X. Kong [et al.] // *J. AIDS.* — 2010. — Vol. 54, № 5. — P.556—559.
- Beignon, A.S.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions / A.S. Beignon, K. McKenna, M. Skoberne [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2005. — Vol. 115, № 11. — P.3265—3275.
- Marchetti, G.* Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4<sup>+</sup>T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy / G. Marchetti, G.M. Bellistri [et al.] // *AIDS.* — 2008. — Vol. 22, № 15. — P.2035—2038.
- Arbour, N.C.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans / N.C. Arbour, E. Lorenz, B.C. Schutte [et al.] // *Nature. Genet.* — 2000. — Vol. 25, № 2. — P.187—191.
- Marsik, C.* The Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms Influence the Late Inflammatory Response in Human Endotoxemia / C. Marsik, B. Jilma, C. Joukhadar // *Clinical Chemistry.* — 2005. — Vol. 51, № 11. — P.2178—2180.
- Ferwerda, B.* Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms / B. Ferwerda, M. McCall [et al.] // *Mol. Med.* — 2008. — Vol. 14, № 5/6. — P.346—352.
- Яковлев, М.Ю.* Системная эндотоксинемия в физиологии и патологии человека: автореф. дис. ... докт. мед. наук / М.Ю. Яковлев; Российская академия мед. наук. — М., 1993. — 57 с.
- Vasan, A.* Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype / A. Vasan, B. Renjifo, E. Hertzmark [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* — 2006. — Vol. 42, № 6. — P.843—852.
- Fenyw, E.M.* Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates / E.M. Fenyw, L. Morfeldt-Menson, F. Chiodi [et al.] // *J. Virol.* — 1988. — Vol. 62, № 11. — P.4414—4419.
- Ioannidis, J.P.* Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data / J.P. Ioannidis, P.S. Rosenberg, J.J. Goedert [et al.] // *Ann. Intern. Med.* — 2001. — Vol. 35, № 9. — P.782—795.
- Lyles, R.H.* Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study / R.H. Lyles, A. Mucoz, T.E. Yamashita [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 181, № 3. — P.872—880.
- Grabar, S.* Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV / S. Grabar, H. Selinger-Leneman, S. Abgrall [et al.] // *AIDS.* — 2009. — Vol. 23, № 9. — P.1163—1169.
- Okulicz, J.F.* Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study / J.F. Okulicz, V.C. Marconi, M.L. Landrum [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 200, № 11. — P.1714—1723.
- Deeks, S.G.* Immune activation see point during early HIV infection predicts subsequent CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T-cell changes independent of viral load / S.G. Deeks, C.M. Kithen, L. Liu [et al.] // *Blood.* — 2004. — Vol. 104, № 4. — P.942—947.

22. *Silvestri, G.* Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterised by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia / G. Silvestri, D.L. Sodora, R.A. Koup [et al.] // *Immunity*. — 2003. — Vol. 18, № 3. — P.441—452.
23. *Tesselaar, K.* Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions / K. Tesselaar, R. Arens, G.M. van Schijndel [et al.] // *Nat. Immunol.* — 2003. — Vol. 4, № 1. — P.49—54.

## REFERENCES

1. *Pantaleo, G.* Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection / G. Pantaleo, S. Menzo, M. Vaccarezza [et al.] // *New. Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 332, № 4. — P.209—216.
2. *Blankson, J.* Elite suppression of HIV-1 replication / J. Blankson, R. Siliciano // *Immunity*. — 2008. — Vol. 29, № 6. — P.845—847.
3. *Betts, M.R.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells / M.R. Betts, M.C. Nason, S.M. West [et al.] // *Blood*. — 2006. — Vol. 107, № 12. — P.4781—4789.
4. *Ascher, M.S.* AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis / M.S. Ascher, H.W. Sheppard // *Clin. Exp. Immunol.* — 1988. — Vol. 73, № 2. — P.165—167.
5. *Grossman, Z.* From HIV infection to AIDS: are the manifestations of effective immune resistance misinterpreted? / Z. Grossman, Z. Bentwich, R.B. Herverman // *Clin. Immunol. Immunopathol.* — 1993. — Vol. 69, № 2. — P.123—135.
6. *Brenchley, J.M.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection / J.M. Brenchley, D.A. Price, T.W. Schacker [et al.] // *Nat. Med.* — 2006. — Vol. 12, № 12. — P.1365—1371.
7. *Jiang, W.* Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection / W. Jiang, M.M. Lederman, P. Hunt [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 199, № 8. — P.1177—1185.
8. *Redd, A.D.* C-reactive protein levels increase during HIV-1 disease progression in Rakai, Uganda, despite the absence of microbial translocation / A.D. Redd, K.P. Eaton, X. Kong [et al.] // *J. AIDS*. — 2010. — Vol. 54, № 5. — P.556—559.
9. *Beignon, A.S.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions / A.S. Beignon, K. McKenna, M. Skoberne [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2005. — Vol. 115, № 11. — P.3265—3275.
10. *Marchetti, G.* Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy / G. Marchetti, G.M. Bellistri [et al.] // *AIDS*. — 2008. — Vol. 22, № 15. — P.2035—2038.
11. *Arbour, N.C.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans / N.C. Arbour, E. Lorenz, B.C. Schutte [et al.] // *Nature. Genet.* — 2000. — Vol. 25, № 2. — P.187—191.
12. *Marsik, C.* The Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms Influence the Late Inflammatory Response in Human Endotoxemia / C. Marsik, B. Jilma, C. Joukhadar // *Clinical Chemistry*. — 2005. — Vol. 51, № 11. — P.2178—2180.
13. *Ferwerda, B.* Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms / B. Ferwerda, M. McCall [et al.] // *Mol. Med.* — 2008. — Vol. 14, № 5/6. — P.346—352.
14. *Yakovlev, M.Yu.* Sistemnaya endotoksinemiya v fiziologii i patologii cheloveka: avtoref. dis. ... dokt. med. nauk / M.Yu. Yakovlev; Rossiiskaya akademiya med. nauk. — M., 1993. — 57 s.
15. *Vasan, A.* Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype / A. Vasan, B. Renjifo, E. Hertzmark [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* — 2006. — Vol. 42, № 6. — P.843—852.
16. *Fenyw, E.M.* Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates / E.M. Fenyw, L. Morfeldt-Menson, F. Chiodi [et al.] // *J. Virol.* — 1988. — Vol. 62, № 11. — P.4414—4419.
17. *Ioannidis, J.P.* Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data / J.P. Ioannidis, P.S. Rosenberg, J.J. Goedert [et al.] // *Ann. Intern. Med.* — 2001. — Vol. 35, № 9. — P.782—795.
18. *Lyles, R.H.* Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study / R.H. Lyles, A. Mucoz, T.E. Yamashita [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 181, № 3. — P.872—880.
19. *Grabar, S.* Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV / S. Grabar, H. Selinger-Leneman, S. Abgrall [et al.] // *AIDS*. — 2009. — Vol. 23, № 9. — P.1163—1169.
20. *Okulicz, J.F.* Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study / J.F. Okulicz, V.C. Marconi, M.L. Landrum [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 200, № 11. — P.1714—1723.
21. *Deeks, S.G.* Immune activation seen point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load / S.G. Deeks, C.M. Kithen, L. Liu [et al.] // *Blood*. — 2004. — Vol. 104, № 4. — P.942—947.
22. *Silvestri, G.* Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterised by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia / G. Silvestri, D.L. Sodora, R.A. Koup [et al.] // *Immunity*. — 2003. — Vol. 18, № 3. — P.441—452.
23. *Tesselaar, K.* Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions / K. Tesselaar, R. Arens, G.M. van Schijndel [et al.] // *Nat. Immunol.* — 2003. — Vol. 4, № 1. — P.49—54.