

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ



КНЫШ С.В.,

к.м.н., доцент, доцент

кафедры нормальной и пато-

логической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, knysh.sv@tgmu.ru



МАРКЕЛОВА Е.В.,

д.м.н., профессор, проректор

по научно-исследовательской

деятельности, заведующая ка-

федрой нормальной и патоло-

гической физиологии ФГБОУ

ВО «Тихоокеанский государ-

ственный медицинский уни-

верситет» Минздрава России,

член Президиума Российского научного общества иммунологов, заслуженный работник высшей школы Российской Федерации, markelova.ev@tgmu.ru



КУЗНЕЦОВ А.С.,

ассистент кафедры нормаль-

ной и патологической физио-

логии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, kuznetsov.as@tgmu.ru



БЕНИОВА С.Н.,

д.м.н., профессор, профес-

сор Школы медицины и наук

о жизни ФГАОУ ВО «Дальне-

восточный федеральный уни-

верситет», beniova.sn@dvfu.ru



КОСТИНОВ М.П.,

член-корреспондент РАН,

д.м.н., профессор, заведу-

ющий лабораторией вак-

цинопрофилактики и имму-

нотерапии аллергических

заболеваний ФГБНУ «Научно-

исследовательский ин-

ститут вакцин и сывороток

им. И.И. Мечникова», заведу-

ющий кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), заслуженный деятель науки Российской Федерации, monolit.96@mail.ru

В работе представлены результаты исследования цитокинов, хемокинов и факторов роста в сыворотке пациентов с ВИЧ-инфекцией методом мультиплексного анализа. Определены различия ряда показателей и особенности корреляционного профиля в зависимости от наличия или отсутствия вирусемии.

Ключевые слова: ВИЧ, цитокиновый статус, мультиплексный анализ, диагностика.

USE OF THE MULTIPLEX ANALYSIS FOR EVALUATION OF THE CYTOKINE STATUS IN THE HIV-INFECTED PATIENTS

Knysh S., Markelova E., Kuznetsov A.,
Beniova S., Kostinov M.

The paper presents the results of the study of cytokines, chemokines and growth factors in the sera of HIV-infected patients by the method of multiplex analysis. Differences of some indicators and particularities of correlation profile are defined depending on the presence or absence of viremia.

Key words: HIV, cytokine status, multiplex analysis, diagnostics.

Введение

Открытия последних лет в области этиологии и патогенеза инфекционных заболеваний подчеркивают целесообразность изучения широкого перечня медиаторов иммунной системы, принимающих участие в реализации того или иного заболевания. ВИЧ-инфекция является показательным примером болезни, отношение к этиопатогенезу и лечению которой менялось в зависимости от текущего состояния научно-медицинского прогресса. В настоящее время ВИЧ считается контролиру-

емым заболеванием преимущественно за счет достижения обширного эпидемиологического контроля и высокой степени доступности фармакотерапии. Однако, несмотря на это, значительное количество пациентов остаются без своевременного доступа к антиретровирусной терапии – главному средству контроля и лечения ВИЧ, а следовательно, и без адекватного вирусологического контроля.

Высокая скорость репликации вируса, рост его генетического разнообразия, постоянная «гонка» между вирусной эволюцией и иммунным контролем обуславливают актуальность изучения дополнительных иммунологических механизмов, медиаторов и их взаимодействия при развитии ВИЧ-инфекции и синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД) для персонализированного контроля заболевания.

В развитии ВИЧ-инфекции высокую роль играет не только прогрессирующее снижение уровня CD4 лимфоцитов, но и неадекватная хроническая активация иммунной системы с последующим нарушением уровней циркулирующих цитокинов и иных медиаторов иммунного ответа [1]. Нарушение работы сигнальных путей и дисрегуляция цитокиновой сети обуславливают усугубление клинического течения ВИЧ-ассоциированных заболеваний и расстройств, которые становится практически невозможно предугадать и контролировать. При этом на фоне применения антиретровирусной терапии (АРТ) в большинстве случаев происходит постепенное восстановление логики (или логики, или коррекции) цитокинового взаимодействия, что в ряде исследований также подтверждается положительным эффектом от сочетанного применения АРТ и цитокин-содержащих препаратов [2, 3].

Цель исследования

Провести оценку ассоциации сыровороточных уровней ряда цитокинов, хемокинов и ростовых факторов с уровнем контроля над вирусом при ВИЧ-инфекции.

Материалы и методы

Данное исследование является частью плановой темы, реализуемой в ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России (ТГМУ). Дизайн и методология научно-исследовательской работы были рассмотрены и одобрены на заседании междисциплинарного комитета по этике ТГМУ.

С учетом критериев включения и исключения в исследование вошли 56 чел. с ВИЧ-инфекцией, находящихся на диспансерном наблюдении в Центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» в г. Владивостоке (Центр СПИД). Средний возраст участников исследования составил 42,86 года ($SD=9,955$), средняя задокументированная длительность ВИЧ-инфекции – 7,61 года ($SD=6,213$). При этом у 39,3% участников длительность болезни составляла менее 5 лет, у 60,7% – 5 лет и более. Половой состав исследуемой когорты был представлен 25 женщинами (44,6%) и 31 мужчиной (55,4%). В общей группе больных были лица как с неопределяемой вирусной нагрузкой (*группа I* – 42 чел. [75%]), так и с недостижимым контролем над репликацией ВИЧ (*группа II* – 14 чел. [25%]).

Забор биологического материала и преаналитическая подготовка проб проводились на базе клинко-диагностической и иммунологической лаборатории Центра СПИД после получения письменного согласия участников.

Исследование уровней цитокинов, хемокинов и ростовых факторов проводилось методом мультиплексного анализа с использованием набора Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel, 48-Plex (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) на системе мультиплексного анализа BioPlex MAGPIX Multiplex Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA).

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы IBM SPSS Statistics 26 методиками, адекватными для полученных данных.

Результаты и обсуждение

Результаты мультиплексного анализа представлены в табл. 1 на с. 90. Значения интерлейкина – 15 (IL–15), интерлейкина – 5 (IL–5), факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) не были определены при проведении мультиплексного анализа, так как показатели были зарегистрированы ниже пределов чувствительности (OOF) используемых наборов реагентов ИФА.

Установлены различия сыровороточного уровня ряда исследованных медиаторов: рецептора интерлейкина 2 альфа (IL–2Ralpha), интерлейкина 8 (IL–8), интерферон-гамма индуцированного протеина 10 (IP–10), моноцитарного хемотаксического протеина–1 (MCP–1), монокина,

Таблица 1

Значения исследуемых медиаторов воспаления в сыворотке крови пациентов с ВИЧ-инфекцией

Показатель, pg/ml	Группа I (n=42), Ме (Q25–Q75)	Группа II (n=14), Ме (Q25–Q75)	p, U-критерий	p, медианный критерий
Basic FGF	12,18 (9,7–14,73)	11,54 (9,7–12,8)	0,357	0,355
CTACK	239,15 (133,38–291,39)	212,61 (185,68–245,29)	0,311	0,123
Eotaxin	22,53 (9,06–31,37)	9,81 (3,04–26,89)	0,130	0,355
G-CSF	5,79 (0,00–10,14)	0,03 (0,00–6,57)	0,063	0,355
GM-CSF	1,15 (0,51–1,88)	1,18 (0,66–1,47)	0,865	0,758
GRO-alpha	433,57 (358,03–460,58)	395,19 (368,35–440,45)	0,256	0,123
HGF	146,36 (104,24–187,62)	111,33 (97,11–137,09)	0,100	0,123
IFN-alpha 2	0,07 (0,00–3,66)	0,00 (0,00–0,13)	0,323	0,536
IFN-gamma	4,68 (3,74–6,09)	4,76 (4,05–5,62)	0,947	0,877
IL-10	2,83 (2,31–3,35)	2,31 (2,31–3,09)	0,229	0,527
IL-12 (p40)	13,57 (0,76–24,44)	24,44 (0,76–41,95)	0,376	0,272
IL-12 (p70)	1,73 (0,92–2,53)	1,57 (0,59–1,89)	0,279	0,536
IL-13	0,88 (0,49–1,52)	0,76 (0,37–1,02)	0,267	0,877
IL-15	OOF	OOF	–	–
IL-16	27,91 (22,99–39,06)	29,10 (23,96–33,70)	0,828	0,758
IL-17	5,21 (4,01–6,82)	4,41 (2,38–7,21)	0,280	0,355
IL-18	18,58 (14,08–32,60)	19,87 (15,04–24,98)	0,887	0,758
IL-1alpha	13,24 (8,86–16,15)	11,05 (8,12–13,24)	0,328	0,123
IL-1beta	0,88 (0,73–1,32)	0,82 (0,64–1,07)	0,393	0,758
IL-1ra	112,32 (93,79–172,61)	107,43 (97,31–167,55)	0,622	0,877
IL-2	1,20 (0,47–1,76)	0,84 (0,47–1,34)	0,209	0,277
IL-2R alpha	17,90 (14,49–26,69)	30,77 (18,91–34,43)	0,032	0,031
IL-3	0,98 (0,83–1,41)	0,83 (0,54–1,19)	0,435	0,755
IL-4	1,60 (1,26–1,95)	1,37 (0,93–1,53)	0,103	0,355
IL-5	OOF	OOF	–	–
IL-6	0,48 (0,00–0,88)	0,18 (0,00–0,97)	0,686	0,758
IL-7	5,29 (3,51–6,12)	4,63 (3,51–6,12)	0,812	0,871
IL-8	7,89 (4,47–16,01)	3,12 (2,56–6,17)	0,006	0,031
IL-9	164,85 (146,99–176,22)	158,85 (133,76–171,97)	0,394	0,877
IP-10	104,18 (57,67–280,79)	182,80 (152,37–335,47)	0,096	0,031
LIF	16,09 (12,78–22,96)	16,09 (12,78–26,53)	0,725	0,758
M-CSF	6,09 (4,19–8,09)	6,84 (4,76–9,34)	0,389	0,643
MCP-1	16,80 (13,26–26,06)	9,83 (9,18–15,90)	0,012	0,123
MCP-3	1,20 (0,75–1,76)	1,02 (0,54–1,52)	0,636	0,758
MIF	367,81 (223,89–534,04)	253,82 (177,29–389,47)	0,212	0,355
MIG	46,96 (33,48–89,15)	156,59 (78,07–319,82)	0,001	0,001
MIP-1alpha	1,17 (0,75–1,65)	0,87 (0,68–1,14)	0,077	0,355
MIP-1beta	47,30 (39,22–56,13)	43,75 (39,13–49,55)	0,267	0,576
PDGF-BB	603,29 (336,81–822,32)	495,82 (173,44–645,08)	0,182	0,355
RANTES	6148,82 (2651,15–15000)	3455,81 (747,80–5962,34)	0,099	0,395
SCF	26,53 (24,21–36,99)	23,96 (18,50–29,87)	0,065	0,877
SCGF-beta	21396,98 (16853–26928)	22757,93 (18142–28246)	0,629	0,817
SDF-1alpha	321,58 (290,52–372,73)	326,28 (309,27–384,10)	0,526	0,758
TNF-alpha	16,73 (14,32–19,49)	18,11 (14,32–25,21)	0,284	0,877
TNF-beta	122,95 (105,46–137,22)	113,04 (79,44–136,59)	0,502	0,758
TRAIL	8,52 (6,93–11,79)	11,25 (8,60–12,55)	0,106	0,123
VEGF	OOF	OOF	–	–
beta-NGF	2,81 (1,79–3,23)	2,47 (1,96–2,98)	0,477	0,355

Таблица 2

Значения различающихся показателей между мужчинами и женщинами

Показатель	P_2 медианный критерий (общая выборка)	P_2 медианный критерий (группа I)	P_2 медианный критерий (группа II)
CTACK	0,032	0,001	1,0
IL-13	0,056	0,031	1,0
IL-17	0,007	0,114	1,0
SCGF-beta	0,020	0,018	1,0
MCP-1	0,591	0,031	1,0

индуцированного интерфероном гамма (MIG, CXCL9), между представителями двух исследуемых групп пациентов.

Преобладание уровня IL-2Ralpha в группе II без различий сывороточных уровней IL-2 может указывать на функциональный дефицит IL-2 у больных данной когорты. Учитывая максимальную, в сравнении с другими видами рецепторов к IL-2, аффинность IL-2Ralpha, можно заключить, что это также может быть подтверждением большей эффективности сопутствующей терапии препаратами IL-2 для лиц с недостижимым контролем над вирусией по причине сопутствующей хронической активации иммунцитов [4, 5].

Сниженный уровень IL-8 в сыворотке крови больных с вирусной персистенцией демонстрирует неоднозначную картину. Большинство исследователей склоняется к тому, что при репликации ВИЧ наблюдается повышение уровня данного цитокина, что связано с потенцированием репликации через рекрутинг CD4+ клеток в лимфатические узлы, однако нельзя исключать, что снижение сывороточного уровня данного показателя лишь указывает на повышенную продукцию IL-8 в отдельных клетках (таких, как астроциты) и прогрессию заболевания [6, 7], а также свидетельствует об истощении пула клеток-продуцентов.

Значения MCP-1, как и IL-8, продемонстрировали динамику, обратную ожидаемой. Однако, основываясь на результатах, представленных в работах, посвященных ВИЧ, можно судить, что сывороточные значения имеют меньшую валидность при определении ассоциации данных хемоаттрактантов с прогрессированием болезни. При этом в нескольких работах подтверждены как увеличение значений MCP-1 в спинномозговой жидкости, так и ассоциация данного роста с развитием ВИЧ-ассоциированных нейрокогнитивных расстройств [8, 9].

Результаты оценки уровней как IP-10, так и MIG, подтвердили данные, опубли-

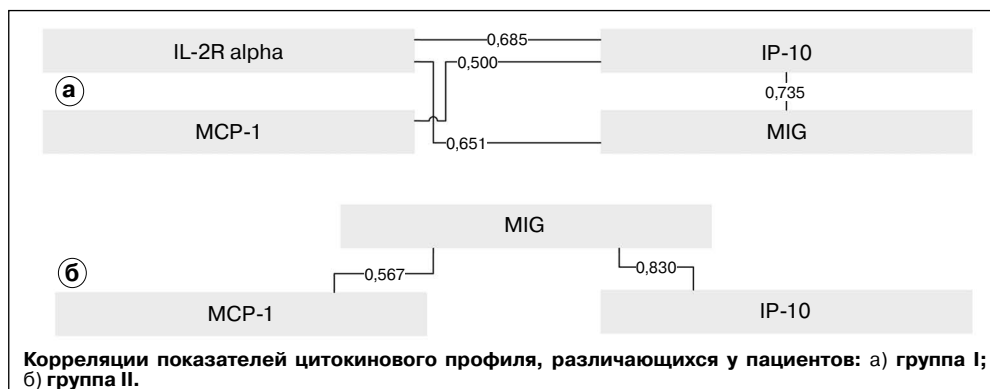
кованные исследователями за последние несколько лет, об ассоциации повышенных уровней этих хемокинов с потерей контроля и прогрессированием заболевания [10, 11].

При оценке различий показателей между мужчинами и женщинами был определен ряд особенностей как в общей выборке пациентов, так и в двух основных группах (табл. 2). Отсутствие различий по всем показателям в группе II может быть как следствием сравнительно небольшой выборки, так и результатом влияния вируса на цитокиновую регуляцию, которая выступает более значимым фактором, чем половой, однако данное суждение требует дальнейшего исследования.

При проведении корреляционного анализа в двух основных группах по различающимся показателям цитокинового профиля было установлено наличие схожей корреляционной пары IP-10 и MIG у всех пациентов, но в случае группы I картина взаимосвязей медиаторов была более сложной (см. рис. на с. 92). У больных группы II было установлено наличие корреляций в парах MIG – IP-10; MIG – MCP-1, в то время как в группе I данные показатели коррелировали иным образом: IP-10 – MCP-1; IP-10 – MIG; IP-10 – IL-2Ralpha; IL2-Ralpha – MIG. Исчезновение валидированных связей IL-2Ralpha с хемокиновыми лигандами может свидетельствовать о реализации механизма вирусной эвазии и подавлении стимуляции интерферон-гамма зависимых путей – одного из важнейших механизмов иммунного контроля над репликацией ВИЧ [12].

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о выраженном влиянии вирусной персистенции на состояние цитокинового статуса пациентов с ВИЧ-инфекцией, которое характеризуется не только изменением сывороточных содержаний основных медиаторов врожденного иммунитета, но и нарушением адекватного взаимодействия



различных механизмов регуляции воспалительного ответа. Зафиксированные различия в содержании ряда цитокинов указывают на целесообразность углубленной оценки их взаимодействия с другими факторами иммунитета и необходимость из-

учения особенностей корреляционных взаимосвязей между цитокинами, хемокинами и факторами роста у пациентов с ВИЧ-инфекцией, что позволит усовершенствовать тактику лечения данной когорты больных.

Литература

1. Musa F., Shaviya N., Mambo F. et al. Cytokine profiles in highly active antiretroviral treatment non-adherent, adherent and naive HIV-1 infected patients in Western Kenya // *African health sciences*. – 2021, 21(4), 1584–1592. Doi /10.4314/ahs.v21i4.12
2. Catalfamo M., Le Saout C., Lane H.C. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012, 23(4–5), 207–214. Doi 10.1016/j.cytogfr.2012.05.007
3. Bordoni V., Sacchi A., Casetti R. et al. Impact of ART on dynamics of growth factors and cytokines in primary HIV infection. *Cytokine*. 2020, 125, 154839. Doi 10.1016/j.cyto.2019.154839
4. Lokau J., Petasch L.M., Garbers C. The soluble IL-2 receptor α /CD25 as a modulator of IL-2 function // *Immunology*. – 2024. – 171(3). – 377–387. Doi:10.1111/imm.13723
5. Muhammad S., Fan T., Hai Y., Gao Y., He J. Reigniting hope in cancer treatment: the promise and pitfalls of IL-2 and IL-2R targeting strategies // *Mol Cancer*. – 2023. – 22(1). 121. Doi: 10.1186/s12943-023-01826-7
6. Pananghat A.N., Aggarwal H., Prakash S.S. et al. IL-8 Alterations in HIV-1 infected children with disease progression // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – 95(21). Doi: 10.1097/MD.0000000000003734
7. Elkwaenger J.H., Valverde-Villegas J.M., Kaminski V.L. et al. Increased IL-8 levels in HIV-infected individuals who initiated ART with CD4⁺ T cell counts <350 cells/mm³ - A potential hallmark of chronic inflammation // *Microbes Infect*. – 2020. – 22(9). – 474–480. Doi: 10.1016/j.micinf.2020.05.019
8. Monteiro de Almeida S., Letendre S., Zimmerman J. et al. Dynamics of monocyte chemoattractant protein type one (MCP-1) and HIV viral load in human cerebrospinal fluid and plasma // *J Neuroimmunol*. – 2005. – 169(1-2). – 144–152. Doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.07.012
9. Gonzalez E., Rovin B.H., Sen L. et al. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. 99(21). – 13795–13800. Doi: 10.1073/pnas.202357499
10. Poveda E., Fitzgerald W., Alonso-Domínguez J. et al. Elevated plasma levels of IP-10 and MIG are early predictors of loss of control among elite HIV controllers // *Front Immunol*. – 2024. – 15. – 1446730. Doi: 10.3389/fimmu.2024.1446730
11. Álvarez H., Gutiérrez-Valencia A., Mariño A. et al. IP-10 and MIG are sensitive markers of early virological response to HIV-1 integrase inhibitors // *Front Immunol*. – 2023. – 14. – 1257725. Doi: 10.3389/fimmu.2023.1257725
12. Roff S.R., Noon-Song E.N., Yamamoto J.K. The Significance of Interferon- γ in HIV-1 Pathogenesis, Therapy and Prophylaxis // *Front Immunol*. – 2014. – 4. – 498. Doi: 10.3389/fimmu.2013.00498