

УДК: [616.98:578.828.6HIV]+616.36-002.2)-074

ЭКСПРЕССИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ У ВИЧ/ВГС КО-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Матиевская Н.В.¹, Цыркунов В.М.¹, Зубрицкий М.Г.², Прокопчик Н.И.²¹- УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь, Гродно²- УЗ «Гродненское областное патологоанатомическое бюро», Беларусь, Гродно

Методом иммуногистохимии в ткани печени 15 пациентов с ВИЧ-инфекцией и 18 пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС установлена частота и степень экспрессии иммунологических маркеров (CD4, CD8, CD56, CD68, HLA-DP, DQ, DR, CCR5, CXCR4), маркеров ВИЧ, ВГС и оппортунистических инфекций (р24 ВИЧ, NS4 HCV, антигенов ВПГ1 и 2 типов, ВПЧ) при разных вариантах поражения печени. Показано, что быстро прогрессирующий вариант поражения печени при ко-инфекции ВИЧ/ВГС характеризуется более высоким содержанием естественных киллеров, активацией клеток воспалительного инфильтрата печени, экспрессией маркеров ВПГ1 и 2 типов в клетках печени по сравнению с медленно прогрессирующим вариантом.

Ключевые слова: ко-инфекция ВИЧ/ВГС, печень, иммуногистохимия, гепатоциты, клетки Купфера, воспалительный инфильтрат, TNF- α , CD56, CCR5, CXCR4, р24 ВИЧ, NS4 HCV, ВПГ 1 и 2 типов.

Введение

В настоящее время накоплено много доказательств неблагоприятного естественного течения ко-инфекции ВИЧ/ВГС у большинства пациентов, сокращения сроков формирования патологии печени, высокой частоты развития цирроза печени (ЦП) и «печеночных» причин смерти. В то же время у 1/3 пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС отсутствуют патоморфологические признаки выраженного поражения печени даже при развитии СПИД [1, 2].

К настоящему времени доказана восприимчивость к ВИЧ практически всех клеток печени: гепатоцитов (ГЦ), клеток Купфера (КК), эндотелиальных клеток печени (ЭКП), звездчатых клеток печени (клетки Ито), лимфоцитов печени (ЛП). ГЦ являются одним из резервуаров ВИЧ-инфекции в печени, что приводит к инфицированию Т-лимфоцитов, а также других клеток печени посредством межклеточных контактов [3].

Большое значение в патогенезе поражения печени при ВИЧ-инфекции придается хемокиновым рецепторам (ХР) CCR5 и CXCR4, экспрессированным на поверхности ГЦ и других клеток печени, являющихся основными ко-рецепторами ВИЧ для входа в клетки, активация которых оказывает модулирующее влияние на иммунный ответ в печени [4].

Инфекция гепатотропными вирусами приводит к формированию воспалительного инфильтрата в печени (ВИП), приводя к изменению соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов и других клеток ВИП [5].

ЛП, несущие на себе рецептор ЕК – молекулу адгезии CD56+, представляют одну из основных популяций ЛП, составляющую 20% в здоровой печени, в то время как содержание ЕК в крови менее 10%. Основная функция этих клеток – ответ на вирусные инфекции и опухолевую трансформацию клеток. Считается, что в ВИП при вирусных гепатитах содержание ЕК может достигать 90% [5].

CD68 – маркер макрофагов и моноцитов, экспрессирован на КК. Обнаружение маркера CD68 в клетках ВИП свидетельствует о миграции данных клеток из крови в ткань печени в ответ на патогенные стимулы [5, 6].

Маркер CD20 позволяет дифференцировать В-лимфоциты в ткани печени, которые играют важную роль в адаптивном гуморальном иммунитете против вирусных гепатитов и ВИЧ. Известно, что у здоровых индивидуумов относительное содержание В-лимфоцитов в печени

приблизительно такое же или несколько меньше, чем в крови [5].

Экспрессия маркера HLA-DP, DQ, DR конститутивно присутствует на антиген презентующих клетках (АПК) и активированных клетках, таких как гранулоциты, активированные тканевые фибробласты, эндотелиоциты, цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ), что свидетельствует об активации клеток и участии их в иммунном ответе [7].

TNF- α индуктор локального воспаления, активирует макрофаги и продукцию оксида азота. Избыточный синтез TNF- α активированными клетками печени вызывает повреждение гепатоцитов с образованием некрозов, индуцирует активацию ЗКП и фиброзообразование в печени [4, 6].

Экспрессия в клетках печени маркеров ВИЧ (р24) и ВГС (протеин NS4) характеризует наличие продуктивной инфекции [8, 9].

Цель исследования: установить частоту и степень экспрессии иммунологических маркеров (CD4, CD8, CD56, CD68, HLA-DP, DQ, DR, CCR5, CXCR4), маркеров ВИЧ (р24), ВГС (NS4 HCV) и оппортунистических инфекций (герпетических вирусов, вируса папилломы человека – ВПЧ) в ткани печени при разных вариантах поражения печени у пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС.

Материалы и методы. Иммуногистохимические (ИГХ) исследования выполнены в 2 группах ВИЧ-инфицированных пациентов: 1 группа – 18 пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС, 2 группа (контрольная) – 15 пациентов с ВИЧ-инфекцией без ВГС. В 31 случае использован аутопсийный материал, в 2-х – прижизненные биоптаты печени. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика пациентов, включенных в исследование

Пациенты, патология печени	1-я группа, n=18 (%)	2-я группа, n=15
Возраст (годы): средний (годы),	36,1 \pm 5,1	39,7 \pm 10,1
Мужчины	7 (38,9)	8 (53,3)
Женщины	11 (61,1)	7 (46,7)
Стадия СПИД	15 (83,3)	14 (93,3)
Применение АРТ	12 (66,7)	1 (6,7)
Цирроз печени	6 (33,3)	1 (6,7)
Гепатит низкой активности	12 (66,7)*	2 (13,3)*
Гепатит умеренной активности	-	1 (6,7)
Туберкулез печени	-	3 (20,0)
Стеатоз печени	-	4 (26,7)
ГЦК	-	1 (6,7)
Отсутствие поражения печени	-	3 (20,0%)

Примечание: * $p < 0,05$, тест χ^2 , ГЦК - гепатоцеллюлярная карцинома печени, АРТ – антиретровирусная терапия

Как видно из представленной таблицы 1, большинство пациентов в группах были на стадии СПИД.

Медленно прогрессирующий вариант поражения печени характеризовался наличием гепатита низкой активности (ГНА) с отсутствием или наличием фиброза портальных трактов. ГНА был установлен у 66,7% пациентов в 1 группе, несмотря на наличие стадии СПИД у 11 из них. У остальных 33,3% пациентов 1 группы имел место быстро прогрессирующий вариант поражения печени с наличием морфологически установленного ЦП, ставшего ведущей причиной смерти в 2 случаях. Во 2 группе ГНА встречался значительно реже ($p < 0,05$), в 3 случаях имел место туберкулез печени, кроме того, был выявлен изолированный диффузный стеатоз и ГЦК.

Для проведения ИГХ исследования использовались фиксированные в формалине и заключенные в парафин кусочки печени. Из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 микрон и переносились на предметные стекла. Срезы высушивали при комнатной температуре, далее их помещали в термостат на 30 мин. при температуре 60°C. На 1 этапе осуществляли депарафинирование гистологических срезов в ксилоле (в батарее из 4 емкостей по 1 мин. в каждой) и дегидратацию в спиртах (в батарее из 4 емкостей в спиртах восходящей крепости по 1 мин. в каждой). Предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер pH 6,0, и помещались на водяную баню при температуре 98°C на 30 мин. На 2 этапе проводилась стандартная предобработка срезов с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывались 3% перекисью водорода в течение 10 мин. На 3 этапе наносились первичные антитела. Использовались моноклональные мышиные антитела (anti-EBV, anti-HIV p24, anti-HPV, anti-human CD4, anti-human CD8, anti-human CD20, anti-human CD56, anti-human HLA-DP, DQ, DR antigen, anti-human CD68) и поликлональные кроличьи антитела (Anti-Herpes Simplex Virus 1 и 2 типов), в стандартном разведении (DakoCytomation). Для определения NS4 HCV в цитоплазме клеток использованы мышиные антитела anti-hepatitis C (AbDserotec), для определения экспрессии XP CCR5 и CXCR4 на клетках печени использовались козы anti-human CD195 и anti-human CD184, соответственно (AbDserotec), для определения TNF- β в клетках печени использованы моноклональные мышиные anti-human TNF- β (AbDserotec). Оценка экспрессии маркеров производилась в 4 типах клеток печени: ГЦ, КК, ЭКП и клетках ВИП. В гепатоцитах, КК и ЭКП определялись маркеры ВИЧ, ВГС, оппортунистических инфекций, а также экспрессия XP CCR5 и CXCR4, HLA-DP, DQ, DR, TNF- β . В ВИП определялась экспрессия CD4, CD8, CD20, CD56, CD68, XP CCR5 и CXCR4, HLA-DP, DQ, DR, TNF- β .

Срезы инкубировались в течение 30 минут при температуре 37°C. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы «ДАКО» с диаминобензидином. Срезы промывались проточной водой, докрашивались гематоксилином и заключались в полистерол. Во всех случаях использован положительный и отрицательный контроль ИГХ реакции. Оценка результатов ИГХ проводилась на световом микроскопе (увеличение 100, 200, 400) в 6 случайных полях зрения. Оценивались локализация окрашивания в клетках, процент и интенсивность положительно окрашенных клеток. Исходя из этого, определялась степень экспрессии маркера, выраженная в баллах. Критерии балльной оценки: 0 баллов – негативное окрашивание, 1 балл –

слабая интенсивность, 2 балла – умеренная, 3 балла – резко выраженная интенсивность. При оценке экспрессии иммунологических маркеров в клетках ВИП подсчитывался процент клеток в инфильтрате, экспрессирующих конкретный маркер. Данные представлены в виде медианы (Q25 – Q75). Статистическая обработка данных проводилась с использованием критериев Mann-Whitney U Test и критерия χ^2 , корреляционного анализа (Spearman), с помощью статистического пакета и прикладных программ «Статистика», v.6.

Результаты

Маркеры оппортунистических инфекций (ОИ), p24 ВИЧ и NS4 HCV в гепатоцитах (ГЦ) представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Частота и степень экспрессии p24 ВИЧ, NS4 HCV и маркеров ОИ в ГЦ у ВИЧ-инфицированных пациентов

Маркеры	1-я группа, n=18			2-я группа, n=15		
	Степень экспрессии			Степень экспрессии		
	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР
p24ВИЧ	12/66,7	3/16,7	1,0 (0,0-1,0)	8/53,3	1/6,7	1,0 (0,0-1,0)
NS4HCV	6/33,3	3/16,7	0,5 (0,0-1,0)	0	0	0
ВПГ1	6/33,3	5/27,8	1,0 (0,0 - 2,0)	4/26,7	5/33,3	1,0 (0,0-2,0)
ВПГ2	4/22,2	5/27,8	0,5 (0,0 - 2,0)	4/26,7	3/20	0,0 (0,0-1,0)
ВПЧ	8/44,4	2/11,1	1,0 (0,0 - 1,0)	5/33,3	0	0,0 (0,0-1,0)
ВЭБ	7/38,9	1/5,6	0,0 (0,0 - 1,0)	5/33,3	3/20	1,0 (0,0-1,0)

Примечание: ВПГ1 – вирус простого герпеса 1 типа; ВПГ2 – вирус простого герпеса 2 типа; ВПЧ – вирус папилломы человека; ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр; p24 – нуклеокапсидный протеин ВИЧ; NS4 HCV – протеин ВГС.

Как видно из таблицы 2, в 1-й и 2-й группах отсутствовали различия в частоте и степени экспрессии маркеров ОИ и p24 ВИЧ.

При проведении корреляционного анализа с включением пациентов обеих групп установлен ряд достоверных связей. Отмечена позитивная корреляция между экспрессией p24 ВИЧ в ГЦ и ко-инфекцией ВГС – $R=0,51$ ($p=0,002$). Экспрессия p24 ВИЧ в ГЦ позитивно коррелировала с экспрессией p24 ВИЧ в КК: $R=0,36$ ($p=0,04$), с экспрессией NS4 HCV в ГЦ – $R=0,37$ ($p=0,03$), экспрессией ВПЧ в ГЦ – $R=0,42$ ($p=0,02$). Экспрессия ВПГ 1 типа в ГЦ позитивно коррелировала с экспрессией ВПГ 1 в КК – $R=0,72$ ($p < 0,0001$) и в ЭКП – $R=0,72$ ($p < 0,0001$). Выявлены корреляции между экспрессией ВПГ 1 и 2 типов в ГЦ – $R=0,63$ ($p < 0,0001$) и ВПГ 1 типа с ВПЧ в ГЦ: $R=0,54$ ($p < 0,002$). Установлена прямая корреляция экспрессии ВПГ 2 в ГЦ с возрастом пациентов – $R=0,35$ ($p=0,04$). Обнаружена корреляция ВЭБ в ГЦ с наличием СПИД – $R=0,35$ ($p=0,04$), степенью воспалительной инфильтрации в портальных трактах – $R=0,38$ ($p=0,04$).

Одновременная экспрессия 4 маркеров: p24 ВИЧ, ВПГ1, ВПГ2 и ВПЧ встречалась у 7 (21,1%) пациентов 1 группы и 2 (6,1%) – 2 группы ($p > 0,05$).

Таблица 3 – Частота и степень экспрессии p24 ВИЧ, NS4 HCV и маркеров ОИ в КК ВИЧ-инфицированных пациентов

Маркеры	1-я группа, n=18			2-я группа, n=15		
	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР
p24ВИЧ	5/27,7	3/16,7	0,0 (0,0-1,0)	0	0	0
NS4 HCV	1/5,6	0	0,0 (0,0-0,0)	0	0	0
ВПГ1	6/33,3	0	0,0 (0,0 - 1,0)	3/20,0	0	0,0 (0,0-1,0)
ВПГ2	3/16,7	0	0,0 (0,0 - 0,0)	0	0	0
ВПЧ	2/11,1	0	0,0 (0,0 - 0,0)	0	0	0
ВЭБ	0	0	0	0	0	0

Примечание: * - $p < 0,05$, Mann-Whitney U Test

Частота и степень экспрессии маркеров р24 ВИЧ, ОИ и NS4 HCV в КК представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, достоверные различия в группах установлены по экспрессии р24 ВИЧ, который был наиболее частым маркером, определяемым в КК пациентов в 1 группе, и отсутствовал в этих же клетках у пациентов 2 группы.

Для изучения особенностей внутрипеченочного иммунного ответа у пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС были сравнены показатели экспрессии иммунологических маркеров на клетках ВИП (таблица 4).

Таблица 4 – Экспрессия иммунологических маркеров на клетках ВИП

Маркер	1-я группа, n=18			2-я группа, n=15		
	10-20% абс/%	>20% абс/%	Медиана, ИКР	10-20% абс/%	>20% абс/%	Медиана, ИКР
CD4 (%)	11/61,1	7/38,9	20,0 (20,0 - 30,0)	12/80,0	3/20	20,0 (20,0-20,0)
CD8 (%)	13/72,2	5/27,8	20,0 (20,0 - 30,0)	15/100,0	0	20,0 (10,0-20,0)
CD20 (%)	7/38,9	11/61,1	25,0 (20,0 - 30,0)	6/40,0	9/60,0	30,0 (20,0-30,0)
CD56 (%)	7/38,9	11/61,1	30,0 (20,0 - 30,0)	8/53,3	7/46,7	20,0 (20,0-40,0)
CD68 (%)	9/50	9/50	20,0 (10,0 -30,0)	9/60,0	6/40,0	20,0 (20,0-30,0)
HLA-DR, DQ, DR (%)	10/55,6	8/44,4	20,0 (10,0 -40,0)	5/33,3	10/66,7	40,0 (20,0-50,0)
CXCR4	15/83,3	3/18,8	10,0 (10,0 - 20,0)	6/40,0	9/60,0	30,0 (10,0-30,0)
CCR5	15/83,3	3/18,8	20,0 (10,0 -20,0)	11/73,3	4/26,7	10,0 (10,0-30,0)

Примечание: * $p < 0,05$, Mann-Whitney U Test

Как видно из таблицы 4, при ко-инфекции ВИЧ/ВГС в составе ВИП отмечено больше клеток с фенотипом CD8+, что ассоциируется с более высоким содержанием ЦТЛ в ВИП и может свидетельствовать как о более активном клеточном иммунном ответе, так и о более выраженных воспалительных реакциях в печени. Медиана соотношения экспрессии CCR5 к CXCR4 на клетках ВИП в 1-й группе составила 1,0 (1,0 – 2,0) и была статистически выше по сравнению с медианой соотношения этих же показателей во 2-й группе – 1,0 (0,5 – 1,0), $p = 0,02$. Установлено, что экспрессия TNF- β в клетках ВИП не различалась достоверно в группах сравнения ($p > 0,05$).

Выявлена прямая корреляционная связь между ко-инфекцией ВГС и экспрессией CD8 ($R = 0,39$, $p < 0,02$) на клетках ВИП при включении в анализ всех пациентов. Это подтверждают данные, представленные в таблице 4, указывая на более высокое содержание ЦТЛ в ВИП при ко-инфекции ВИЧ/ВГС по сравнению с пациентами без ко-инфекции ВГС. Обнаружена обратная корреляция между экспрессией CD68 на клетках ВИП ($R = -0,43$, $p = 0,01$) и развитием СПИД, что указывает на снижение содержания макрофагов в ВИП при развитии СПИД.

Известно, что в условиях вирусной инфекции ГЦ приобретает свойства АПК и экспрессирует ряд маркеров, присущих данным клеткам [3, 4]. В связи с этим была определена экспрессия HLA-DR, DQ, DR, XP CCR5 и CXCR4 на ГЦ и КК. Кроме того, была изучена экспрессия TNF- β – цитокина, участвующего в активации клеток печени (таблица 5).

Таблица 5 – Экспрессия HLA-DR, DQ, DR, CCR5, CXCR4 и TNF- β в ГЦ и КК

Маркер	1-я группа, n=18			2-я группа, n=15		
	10-20% абс/%	>20% абс/%	Медиана, ИКР	10-20% абс/%	>20% абс/%	Медиана, ИКР
CD4 (%)	11/61,1	7/38,9	20,0 (20,0 - 30,0)	12/80,0	3/20	20,0 (20,0-20,0)
CD8 (%)	13/72,2	5/27,8	20,0 (20,0 - 30,0)	15/100,0	0	20,0 (10,0-20,0)
CD20 (%)	7/38,9	11/61,1	25,0 (20,0 - 30,0)	6/40,0	9/60,0	30,0 (20,0-30,0)
CD56 (%)	7/38,9	11/61,1	30,0 (20,0 - 30,0)	8/53,3	7/46,7	20,0 (20,0-40,0)
CD68 (%)	9/50	9/50	20,0 (10,0 -30,0)	9/60,0	6/40,0	20,0 (20,0-30,0)
HLA-DR, DQ, DR (%)	10/55,6	8/44,4	20,0 (10,0 -40,0)	5/33,3	10/66,7	40,0 (20,0-50,0)
CXCR4	15/83,3	3/18,8	10,0 (10,0 - 20,0)	6/40,0	9/60,0	30,0 (10,0-30,0)
CCR5	15/83,3	3/18,8	20,0 (10,0 -20,0)	11/73,3	4/26,7	10,0 (10,0-30,0)

Примечание: * $p < 0,05$, Mann-Whitney U Test, ГЦ – гепатоциты, КК – клетки Купфера

Как видно из таблицы 5, экспрессия XP CCR5 и CXCR4 была слабо выражена на ГЦ в обеих группах. Как в 1-й группе ($p = 0,01$), так и во 2-й ($p = 0,001$), отмечено достоверное различие в экспрессии CXCR4 на ГЦ и КК. Кроме того, во 2-й группе установлено достоверное различие в экспрессии TNF- β в ГЦ и КК ($p < 0,01$). Обнаружено достоверное различие ($p < 0,01$) в экспрессии маркера активации HLA-DR, DQ, DR на КК в группах пациентов, поскольку во 2-й группе этот маркер отсутствовал, а в 1-й группе выявлялся у 6 пациентов (33,3%). Наличие активированных КК в синусоидах печени коррелировало с экспрессией TNF- β в КК ($R = 0,37$, $p < 0,03$) и экспрессией HLA-DR, DQ, DR на клетках ВИП ($R = 0,40$, $p < 0,02$).

Не вызывает сомнения роль продуктивной ВИЧ-инфекции в патогенезе поражения печени [4, 6]. В связи с этим изучены показатели экспрессии маркеров в ГЦ и КК у пациентов 1 группы с учетом одновременной экспрессии р24 ВИЧ в ГЦ и КК (таблица 6).

Таблица 6 – Экспрессия NS4 HCV, ВПГ1, HLA-DR, DQ, DR и TNF- β в ГЦ в зависимости от экспрессии р24 ВИЧ в ГЦ и КК при ко-инфекции ВИЧ/ВГС

Маркер	ВИЧ/ВГС, n=8			ВИЧ/ВГС, n=10		
	Наличие экспрессии р24 ВИЧ	Отсутствие экспрессии р24 ВИЧ		Отсутствие экспрессии р24 ВИЧ		Медиана, ИКР
	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР
NS4 HCV в ГЦ	4/50,0	3/37,5	1,0 (1,0 -2,0)	2/20	0	0 (0,0 - 0,0)
ВПГ1 в ГЦ	5/62,0	2/25	1,0 (1,0 - 1,0)	3/30	1/10	0 (0,0 - 0,1)
HLA-DR, DQ, DR в КК	3/37,5	2/25	0,5 (0,0 - 1,0)	1/10	0	0 (0,0 - 0,0)
TNF- α в КК	6/75,0	0	1 (0,5 - 1,0)	1/10	0	0 (0,0 - 0,0)

Примечание: * $p < 0,05$, Mann-Whitney U Test

Как видно из таблицы 6, получены достоверные различия в экспрессии NS4 HCV в ГЦ в сравниваемых группах, что указывает на синергизм ВИЧ и ВГС при инфицировании ГЦ и КК. Отмечена более выраженная экспрессия маркера активации на КК и TNF- β в КК при продуктивной ВИЧ-инфекции клеток печени.

Отмечены корреляции между экспрессией ВПГ1 типа и экспрессией на клетках ВИП маркера HLA-DR, DQ, DR - $R = 0,53$ ($p = 0,001$). Установлена корреляция между экспрессией р24 ВИЧ в ГЦ с экспрессией CCR5 на КК: $R = 0,36$ ($p = 0,04$). Экспрессия р24 ВИЧ в ГЦ имела прямые корреляционные связи с экспрессией на клетках ВИП маркера макрофагов CD68 – $R = 0,40$ ($p < 0,02$), CXCR4 – $R = 0,50$ ($p < 0,01$) и CCR5 – $R = 0,55$ ($p < 0,001$).

Экспрессия NS4 HCV в ГЦ была выявлена у 50% пациентов 1 группы, отмечены достоверные различия в экспрессии р24ВИЧ и маркера активации в КК в зависимости от данного показателя (таблица 7).

Таблица 7 – Экспрессия р24 ВИЧ, HLA-DR в клетках Купфера в зависимости от экспрессии NS4 HCV в гепатоцитах при ко-инфекции ВИЧ/ВГС

Маркер	ВИЧ/ВГС, n=9			ВИЧ/ВГС, n=9		
	Наличие экспрессии NS4 HCV	Отсутствие экспрессии NS4 HCV		Отсутствие экспрессии NS4 HCV		Медиана, ИКР
	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР
р24 ВИЧ в КК	4/44,4	3/33,3	1 (1 - 2)	1/5,6	0	0 (0 - 0)
HLA-DR, DQ, DR в КК	4/44,4	2/11,1	1 (0 - 1)	0	0	0 (0 - 0)

Примечание: * $p < 0,05$, Mann-Whitney U Test

Как видно из таблицы 7, экспрессия NS4 HCV в ГЦ ассоциировалась со значительно более выраженной экспрессией р24ВИЧ и наличием экспрессии HLA-DR, DQ, DR в КК. Отмечена корреляция NS4 HCV в ГЦ с наличием ЦП $R = 0,37$ ($p = 0,03$).

При сравнении экспрессии иммунологических маркеров на клетках ВИП при различных морфологических

вариантах поражения печени установлены достоверные различия по двум показателям (таблица 8).

Таблица 8 – Экспрессия иммунологических и вирусных маркеров на клетках ВИП, в ГЦ и КК пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС при разных морфологических вариантах поражения печени

Маркеры	Медленно прогрессирующий вариант (ГНА), n=12			Быстро прогрессирующий вариант (ЦП), n=6		
	10-20% абс/%	>20% абс/%	Медиана, ИКР	10-20% абс/%	>20% абс/%	Медиана, ИКР
HLA-DP, DQ, DR в ВИП	9/75,0	4/33,3	15 (10-30)	1/16,7	5/83,3	45 (30-50)*
CD56 в ВИП	7/58,3	5/41,7	20 (20-30)	0	6/100	35 (30-50)*
Маркеры	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР	1 балл абс/%	>1 балла абс/%	Медиана, ИКР
ВИП 1 в ГЦ	6/50,0	0	0,5 (0,0 - 1,0)	0	5/83,3	2,0 (2,0-2,0)
ВИП 1 в КК	1/8,3	0	0,0 (0,0-0,0)	5/83,3	0	1,0 (1,0-1,0)
ВИП 2 в КК	0	0	0,0 (0,0-0,0)	3/50,0	0	0,5 (0,0-1,0)

Примечание: ГНА – гепатит низкой активности, ЦП – цирроз печени; КК – клетки Купфера, ВИП – воспалительный инфильтрат печени; * $p < 0,05$, Mann-Whitney U Test

Как видно из таблицы 8, при быстро прогрессирующем варианте поражения печени отмечена более выраженная активация клеток ВИП и большее содержание ЕК в ВИП, а также более выраженная экспрессия АГ ВИП 1 и 2 типов в ГЦ и КК. Экспрессия остальных клеточных и вирусных маркеров в клетках печени не различалась в сравниваемых группах.

Обнаружены обратные корреляционные связи ГНА у ВИЧ-инфицированных пациентов с экспрессией ВИП 1 в различных клетках печени: в ГЦ – $R = -0,48$ ($p = 0,004$); в КК – $R = -0,39$ ($p = 0,03$); в ЭКП – $R = -0,44$ ($p < 0,001$).

Обсуждение

До недавнего времени считалось, что ЛП являются компонентом ВИП, мигрируя из крови в ответ на различные патологические стимулы (токсины, вирусы, лекарства и т.д.). Однако во многих исследованиях было показано, что печень взрослого человека содержит популяцию собственных ЛП, не относящихся к циркулирующим лимфоцитам крови. В здоровой печени взрослого человека имеются выраженные различия в составе ЛП и лимфоцитов крови. Печень содержит как обычные циркулирующие в крови Т- и В-лимфоциты, естественные киллеры (ЕК), так и минорные субпопуляции лимфоцитов, содержащиеся в незначительном количестве в крови: гд Т-лимфоциты, 19% Т-лимфоцитов, негативных по экспрессии CD4 и CD8, 5% Т-лимфоцитов, одновременно экспрессирующих оба маркера. В печени содержится обширная популяция ЕК (до 20%), ЕК Т-лимфоцитов, В-1 лимфоцитов, лимфоидных дендритных клеток. При патологии печени отмечается изменение состава ЛП за счет привлечения в печень различных клеток и формирования ВИП. Соотношение CD4/CD8 Т-лимфоцитов в печени здорового человека составляет 1:3,5, в то время как соотношение этих клеток в крови – 2:1, что указывает на относительно более высокий уровень ЦТЛ в печени по сравнению с кровью. Это связывают со «специализированным» ответом печени преимущественно на внутриклеточные патогены и опухолевую трансформацию клеток более, чем на внеклеточные антигены [5]. Наши результаты продемонстрировали приблизительно равное содержание CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в ВИП как в 1-й, так и во 2-й группах пациентов, что указывает на снижение содержания CD8+ клеток в ткани печени и согласуется с данными, полученными в других исследованиях [11]. В то же время в группе ко-инфицированных пациентов отмечено более высокое содержание ЦТЛ по сравнению с пациентами без ко-инфекции ВГС.

Клетки ВИП, экспрессирующие CD56, относятся к естественным киллерам [7]. ЕК принимают участие в адаптивном и врожденном иммунном ответе в печени. Содержание этих клеток в группах пациентов несколько превышало содержание их в здоровой печени (20%), значительное увеличение содержания данных клеток отмечено при ЦП.

Установлено, что взаимодействие поверхностного рецептора ВИЧ gp120 с CXCR4 индуцирует Fas-L-зависимый механизм апоптоза неинфицированных гепатоцитов, приводя к быстрой прогрессии поражения печени. Было также показано, что при ко-инфекции ВИЧ/ВГС совместное взаимодействие gp120 Т- или М-тропного вариантов ВИЧ и оболочечного протеина E2 HCV с XP CXCR4 также активирует механизмы Fas-L-зависимого механизма апоптоза [4, 12]. В 1 группе отмечена менее выраженная экспрессия XP CXCR4, который используется как ко-рецептор Х4-тропными вариантами ВИЧ. Известно, что XP CXCR4 модулирует иммунный ответ и проявляет себя как маркер торможения иммунного ответа, в отличие от XP CCR5, который ассоциируется с активацией клеточного иммунного ответа [13]. Обращает на себя внимание разное соотношение экспрессии 2 XP (медиана) в 1 и 2 группах: в 1 группе экспрессия CCR5 превышала экспрессию CXCR4 на клетках ВИП, в то время как во 2 группе отмечена обратная закономерность – экспрессия CXCR4 превышала экспрессию CCR5, что подтверждается статистически более высоким показателем соотношения CCR5 и CXCR4 и указывает на превалирование процессов активации клеточного иммунитета в 1 группе пациентов по сравнению со 2 группой. Обнаружена обратная корреляционная связь экспрессии CXCR4 на клетках ВИП со стадией СПИД ($R = -0,38$, $p = 0,03$) и ко-инфекцией ВГС ($R = -0,44$, $p < 0,01$).

HLA-DP, DQ, DR отсутствует на покоящихся Т-клетках. В связи с чем данный маркер рассматривается как маркер активации иммунных клеток [14]. Установлена повышенная экспрессия HLA-DP, DQ, DR на КК при ко-инфекции ВИЧ/ВГС. Данный факт указывает на более выраженную активацию КК у пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС по сравнению с пациентами без ко-инфекции ВГС. Наиболее высокое содержание данного маркера на клетках ВИП отмечено при ЦП, что указывает на неблагоприятный исход выраженной активации клеток печени.

Неструктурный NS4B протеин ВГС играет ключевую роль в репликации вируса ВГС, так как индуцирует формирование мембранной сети на эндоплазматической сети в процессе репликации РНК ВГС. В связи с этим экспрессия маркера свидетельствует о продуктивной ВГС-инфекции клеток [8]. Установлено, что 50% пациентов в группе ко-инфекции ВИЧ/ВГС имели продуктивную инфекцию ВГС, которая ассоциировалась с более высокой экспрессией ВИЧ в КК и более выраженной активацией КК, что подтверждает синергизм действия ВИЧ и ВГС при ко-инфекции и является одной из причин индукции ускоренного фиброобразования. Подтверждением данного заключения является наличие достоверной корреляционной связи между продуктивной ВГС-инфекцией в ГЦ и ЦП.

Протеин р24 ВИЧ является капсидным протеином ВИЧ, участвует в пространственной укладке молекул всех прочих белков ВИЧ, в связи с чем обнаружение его в клетках печени указывает на продуктивную ВИЧ-инфекцию [9, 15]. Одновременное инфицирование ВИЧ ГЦ и КК обнаружено у 44,4% пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС. У пациентов без ко-инфекции ВГС экспрес-

сия ВИЧ в КК отсутствовала. У пациентов с ко-инфекцией продуктивная ВИЧ-инфекция клеток печени ассоциировалась с более выраженной экспрессией NS4 протеина в ГЦ, увеличением частоты активированных КК, увеличением в них экспрессии TNF- β , повышенной экспрессии ВПГ 1 типа, что также подтверждает синергизм воздействия ВИЧ и ВГС на течение патологии печени, связь активации иммунных реакций в печени с репликацией ВИЧ и ВГС в клетках печени.

TNF- β - цитокин, синтезируемый ЕК, ЕК-Т-лимфоцитами Th1-типа. Наряду с IFN- γ , TNF- β участвует в нецелитическом иммунном ответе (ИО), который приводит к нарушению репликации ВГС, не вызывая деструкцию клеток печени. TNF- β является активным участником защиты против ВГС-инфекции как на стадии неспецифического ИО, так и при адаптивном иммунном ответе. TNF- β является доказанным профиброгенным цитокином [16, 17, 18]. У пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС обнаружена значительно более высокая экспрессия данного цитокина в КК при продуктивной ВИЧ-инфекции печени, а также корреляция между экспрессией данного цитокина и активированными клетками КК в синусоидах, что указывает на более высокий фиброгенный потенциал ко-инфекции по сравнению с ВИЧ-инфекцией без ВГС.

Литература

1. Патоморфология печени у ВИЧ-инфицированных пациентов / Н.В. Матиевская [и др.] // Инфекційні хвороби. – 2012. – № 3 (69). – С. 15-23.
2. «Печеночная» летальность ВИЧ-инфицированных пациентов / Н.В. Матиевская [и др.] // Медицинская панорама. – 2011. – № 1 (118). – С. 3-6.
3. Price, J.C. Liver Disease in the HIV-Infected Individual / J.C. Price, C. Thio // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2010. – Vol. 8, № 12. – P. 1002-1012.
4. Hepatitis C and Human Immunodeficiency Virus Envelope Proteins Cooperatively Induce Hepatocytic Apoptosis via an Innocent Bystander Mechanism / N. Munshi et al. // The Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 188. – P.1192-1204
5. Gershwin, M.E. Immunopathogenesis and therapy of hepatitis C / M.E. Gershwin, J.M. Vierling, M.P. Manns // Liver Immunology / Hanley&Belfus, Ink. – Philadelphia, 2003. – 498 p.
6. Crane, M. Human immunodeficiency virus infection and the liver / M. Crane, D. Iser, S. Lewin // World J. Hepatol. – 2012. – № 4 (3). – P. 9-98.
7. Хаитов, Р.М. Иммунология : учеб. для студентов мед. вузов / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнат'ева, И.Г. Сидорович. – Москва : Медицина, 2000. – 432 с.
8. Joyce, M.A. The cell biology of hepatitis C virus / M.A. Joyce, D. Lorne, J. Tyrrell // Microbes and Infect. xx. – 2010. – P. 1-9.
9. A monoclonal antibody that recognizes a formalin-resistant epitope on the p24 core protein of HIV-1 / G. Kaluza [et al] // Path., Res. and Pract. – 1992. – Vol. 188. – P. 91-96.
10. Беляков, Н.А. Вирус иммунодефицита человека – медицина / Н.А. Беляков; под ред. Н.А. Белякова, А.Г. Рахмановой. – 2-е изд. – Санкт-Петербург :Балт. мед.образоват. центр, 2011. – Гл. 2 : Патология ВИЧ-инфекции / М.Р. Бобкова. – С. 39-62.
11. Preservation of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responses despite global loss of CD4+T cells in HCV/HIV coinfection / C. Morishima et al. // The Journal of Infectious Diseases. – 2007. –Vol. 196. – P. 577-586.
12. Human Immunodeficiency Virus-Induced Apoptosis of Human Hepatocytes via CXCR4 / S. R. Vlahakis et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 188. – P.1455-1460.
13. Матиевская, Н.В. Особенности клеточного иммунитета у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГС / Н.В. Матиевская, В.М. Цыркунов, А.Е. Гончаров // Инфекционные болезни. – 2012. – Т. 10,

Заклучение

Установлены иммунологические признаки, доказывающие более выраженную активацию внутрипеченочного иммунитета у пациентов с ко-инфекцией ВИЧ/ВГС по сравнению с пациентами без ко-инфекции ВГС: большее содержание ЦТЛ в ВИП, активированных КК в синусоидах печени и более высокая частота продуктивной ВИЧ-инфекции КК. Продуктивная ВИЧ- и ВГС-инфекция гепатоцитов и КК приводила к более выраженной активации КК и повышенной экспрессии в них TNF- β . Быстро прогрессирующий вариант поражения печени при ко-инфекции ВИЧ/ВГС характеризуется более выраженной активацией клеток ВИП, повышением содержания ЕК в ВИП и ассоциируется с более выраженной экспрессией маркеров герпетических инфекций ВПГ 1 и 2 типов в клетках печени по сравнению с медленно прогрессирующим вариантом. Полученные результаты обосновывают необходимость применения терапевтических подходов, направленных на редукцию продуктивной ВИЧ- и ВГС-инфекции в печени, позволяющей снизить избыточную активацию воспалительных иммунных реакций и экспрессию маркеров оппортунистических инфекций.

Literature

1. Patomorfologiya pečeni u VICH-inficirovannyh pacientov / N.V. Matievskaya [i dr.] // Infekciinihvorobi. – 2012. – № 3 (69). – S. 15-23.
2. «Pechenchnaya» letal'nost' VICH-inficirovannyh pacientov / N.V. Matievskaya [i dr.] // Medicinskaya panorama. – 2011. – № 1 (118). – S. 3-6.
3. Price, J.C. Liver Disease in the HIV-Infected Individual / J.C. Price, C. Thio // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2010. – Vol. 8, № 12. – P. 1002-1012.
4. Hepatitis C and Human Immunodeficiency Virus Envelope Proteins Cooperatively Induce Hepatocytic Apoptosis via an Innocent Bystander Mechanism / N. Munshi et al. // The Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 188. – P.1192-1204.
5. Gershwin, M.E. Immunopathogenesis and therapy of hepatitis C / M.E. Gershwin, J.M. Vierling, M.P. Manns // Liver Immunology / Hanley&Belfus, Ink. – Philadelphia, 2003. – 498 p.
6. Crane, M. Human immunodeficiency virus infection and the liver / M. Crane, D. Iser, S. Lewin // World J. Hepatol. – 2012. – № 4 (3). – P. 9-98.
7. Haitov, R.M. Immunologiya : ucheb.dlya studentov med. vuzov / R.M. Haitov, G.A. Ignat'eva, I.G. Sidorovich. – Moskva : Medicina, 2000. – 432 s.
8. Joyce, M.A. The cell biology of hepatitis C virus / M.A. Joyce, D. Lorne, J. Tyrrell // Microbes and Infect. xx. – 2010. – P. 1-9.
9. A monoclonal antibody that recognizes a formalin-resistant epitope on the p24 core protein of HIV-1 / G. Kaluza [et al] // Path., Res. and Pract. – 1992. – Vol. 188. – P. 91-96.
10. Belyakov, N.A. Virus immunodeficitu cheloveka – medicina / N.A. Belyakov; pod red. N.A. Belyakova, A.G. Rahmanovoi. – 2-e izd. – Sankt-Peterburg :Balt. med.obrazovat. centr, 2011. – Gl. 2 : Patofiziologiya VICH-infekcii / M.R. Bobkova. – S. 39-62.
11. Preservation of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responses despite global loss of CD4+T cells in HCV/HIV coinfection / S. Morishima et al. // The Journal of Infectious Diseases. – 2007. –Vol. 196. – P. 577-586.
12. Human Immunodeficiency Virus-Induced Apoptosis of Human Hepatocytes via CXCR4 / S. R. Vlahakis et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 188. – P.1455-1460.
13. Matievskaya, N.V. Osobennosti kletchnogo immuniteta u pacientov s koinfekciei VICH/VGS / N.V. Matievskaya, V.M. Cyrkunov, A.E. Goncharov // Infekcionnye bolezni. – 2012. – T. 10, № 4. – S. 6-11.

№ 4. – С. 6-11.

14. Activation and Cell Cycle Antigens in CD4+ and CD8+ T Cells Correlate with Plasma Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) RNA Level in HIV-1 Infection / J.M. Orendi [et al.] // The J. of Infect. Dis. – 1998. – № 178. – P. 1279-1287.

15. Engelman, A. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights / A. Engelman, P. Cherepanov // Nat. Rev. Microbiol. – 2012. – Vol. 10. – P. 279-290.

16. Human Immunodeficiency Gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver brogenesis / R. Bruno [et al.] // Gut. – 2010. – № 59. – P. 513-520.

17. Balasubramanian, A. Underlying pathophysiology of HCV infection in HIV positive drug users / A. Balasubramanian, J.E. Groopman, R. K. Ganju // J. Addict. Dis. – 2008. – Vol. 27 (2). – P. 75-82.

18. Virus (HIV)-1 Infects Human Hepatic Stellate Cells and Promotes Collagen I and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression: Implications for the Pathogenesis of HIV/Hepatitis C Virus – Induced Liver Fibrosis / A.C. Tuyama [et al.] // Hepatology. – 2010. – № 52 (2). – P. 612-622.

14. Activation and Cell Cycle Antigens in CD4+ and CD8+ T Cells Correlate with Plasma Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) RNA Level in HIV-1 Infection / J.M. Orendi [et al.] // The J. of Infect. Dis. – 1998. – № 178. – P. 1279-1287.

15. Engelman, A. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights / A. Engelman, P. Cherepanov // Nat. Rev. Microbiol. – 2012. – Vol. 10. – P. 279-290.

16. Human Immunodeficiency Gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver fibrogenesis / R. Bruno [et al.] // Gut. – 2010. – № 59. – P. 513-520.

17. Balasubramanian, A. Underlying pathophysiology of HCV infection in HIV positive drug users / A. Balasubramanian, J.E. Groopman, R. K. Ganju // J. Addict. Dis. – 2008. – Vol. 27 (2). – P. 75-82.

18. Virus (HIV)-1 Infects Human Hepatic Stellate Cells and Promotes Collagen I and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression: Implications for the Pathogenesis of HIV/Hepatitis C Virus – Induced Liver Fibrosis / A.C. Tuyama [et al.] // Hepatology. – 2010. – № 52 (2). – P. 612-622.

EXPRESSION OF IMMUNOLOGICAL AND VIRAL ANTIGENS IN LIVER TISSUE OF HIV/HCV CO-INFECTED PATIENTS

Matiyevskaya N.V.¹, Tsyrcunov V.M.¹, Zubritskiy M.G.², Prokopchik N.I.²

¹Educational Establishment «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

²Health Care Institution “Grodno Regional Pathoanatomical Bureau”, Grodno, Belarus

The frequency and degree of expression of CD4, CD8, CD56, CD68, HLA-DP, DQ, DR, CCR5, CXCR4, p24 HIV, NS4 HCV, HSV 1 and 2 types, HPV antigens in liver tissue has been detected by immunohistochemical methods in 18 patients with HIV/HCV co-infection and in 15 patients with HIV infection. Among HIV/HCV co-infected patients rapid progression of the liver disease was associated with higher content of natural killers, higher activation of inflammatory infiltrate cells of liver tissue and also higher expression of HSV 1 and 2 antigens in liver cells in comparison with patients with slow progression of the liver disease.

Key words: HIV/HCV co-infection, liver, immunohistochemistry, hepatocytes, Kupffer cells, inflammatory infiltrate, TNF- α , CD56, CCR5, CXCR4, p24 HIV, NS4 HCV, HSV types 1 and 2.

Адрес для корреспонденции: e-mail: keth1@rambler.ru

Поступила 20.11.2013