

¹Tadeusz Wojciech Łapiński, ¹Joanna Pogorzelska, ¹Anna Grzeszczuk, ¹Magdalena Świdarska,
²Oksana Kowalczyk, ²Jacek Nikliński, ¹Robert Flisiak

ZNACZENIE STĘŻENIA sCD40 I sCD40L U CHORYCH Z PRZEWLEKŁYM ZAKAŻENIEM HCV I KOINFEKCJĄ HIV

¹Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

²Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

STRESZCZENIE

Receptor CD40 pobudzany jest przez ligand CD40L (CD154) syntetyzowany w stanie zapalnym przez NK, monocyty i limfocyty B. Pobudzenie CD40 aktywuje w komórkach proteiny TRAF, które pobudzają różne szlaki enzymatyczne. Wysokie stężenie CD40L powodując pobudzenie CD40, a w konsekwencji system STAT hamuje ekspresję białek niestrukturalnych NS3 i NS5A HCV oraz rdzenia E2 w zakażonych ludzkich hepatocytach.

CEL PRACY. Celem pracy była ocena stężenia sCD40 i sCD40L w surowicy chorych zakażonych HCV oraz zakażonych HCV/HIV-1. Wśród badanych pacjentów określono wpływ genotypu HCV, wiremii HIV i HCV oraz polimorfizmu genu rs12979860 na stężenie sCD40 i sCD40L. W grupie zakażonych HIV-1 oceniono wpływ liczby CD3+, CD4+ i CD8+ na stężenie sCD40 i sCD40L.

MATERIAŁ I METODY. Badaniem objęto 68 chorych zakażonych HCV (39 zakażonych HCV i 29 zakażonych HCV/HIV-1). Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób. Stężenie sCD40 i sCD40L określono w surowicy przy użyciu testów ELISA.

WYNIKI. Stężenie sCD40 i sCD40L wśród zakażonych HCV i HCV/HIV-1 było znamienne wyższe w porównaniu do osób zdrowych (25,7 i 23,2 v. 8,5 pg/ml oraz 12,7 i 7,3 v. 0,79 ng/ml). Stężenie sCD40L wśród chorych z genotypem CC rs12979860 było znamienne wyższe w porównaniu do chorych z genotypami nie-CC (11,8 v. 7,6 ng/ml, $p < 0.018$).

WNIOSKI. Wśród pacjentów przewlekle zakażonych HCV i HCV/HIV-1 występuje wysokie stężenie sCD40 i sCD40L. Wysokie stężenie sCD40L koreluje z występowaniem genotypu CC rs12979860.

Słowa kluczowe: sCD40, sCD40L, HCV, HIV

WSTĘP

CD40 jest przezbłonowym, proteinowym receptorem typu I zaliczanym do grupy receptorów TNF. Występuje na licznych komórkach, w tym na limfocytach B i T, komórkach plazmatycznych, monocytach, komórkach dendrytycznych, komórkach okazjonalnie prezentujących antygen. Receptor ten jest pobudzany przez ligand CD40L (CD154), syntetyzowany przez komórki CD4+, a w stanie zapalnym przez NK, monocyty i limfocyty B. We krwi, szczególnie w okresie stanu zapalnego występuje wolny ligand sCD40L. Ligandy CD40 są polipeptydami należącym do rodziny TNF. Pobudzenie CD40 przez te ligandy aktywuje w komórkach proteiny TRAF, które pobudzają szlaki enzymatyczne, takie jak MAPK, JNK, MEKK1, STAT (1). CD40-CD40L

odgrywa istotną rolę w procesach immunologicznych, regulacji apoptozy, aktywacji odpowiedzi przeciwwirusowej. W badaniach doświadczalnych wykazano, że aktywacja receptorów CD40 pobudza reakcje zapalne i autoimmunologiczne (2). Limfocyty B prezentujące receptory CD40 po ich aktywacji przez CD40L ulegają pobudzeniu i przekształceniu (3). Odgrywają one istotną rolę w aktywacji układu dopełniacza, indukcji immunofagocytozy oraz cytotoxyczności komórkowej zależnej od przeciwciał. Ponadto, silne budzenie CD40 indukuje w limfocytach B ekspresję Fas uaktywniając procesy apoptozy. Aktywacja makrofagów z receptorami CD40 pobudza w nich syntezę i wydzielanie cytokin, takich jak IL1, IL6, IL8 i IL10 i IL12, TNF- α , metaloproteinaz macierzy oraz autokrynych i parakrynych czynników wzrostu. W zakażeniu HCV i HIV rolę drugiego sygna-

łu (koreceptora) może pełnić receptor CD40 łączący się z CD40L (3). *Rau* i wsp. wykazali, że CD40L hamuje ekspresję białek niestrukturalnych NS3 i NS5A HCV oraz rdzenia E2 w zakażonych ludzkich hepatocytach (PHH) Huh7.5 (1)

CEL PRACY

Celem pracy była ocena stężenia sCD40 i sCD40L w surowicy przewlekle zakażonych HCV oraz zakażonych HCV/HIV, określenie wpływu genotypu HCV na stężenie badanych białek, ocena wpływu polimorfizmu genu rs12979860 na stężenie sCD40 i sCD40L.

Wśród zakażonych HCV/HIV oceniono zależność pomiędzy stężeniem sCD40 i sCD40L a liczbą CD4+.

Ponadto określono zależność pomiędzy stężeniem sCD40 i sCD40L a liczbą komórek CD3+, CD4+, CD8+ wśród chorych zakażonych HCV/HIV.

MATERIAŁY I METODY

Badaniami objęto 68 zakażonych HCV (29 zakażonych HCV/HIV-1 i 39 z monoinfekcją HCV) w wieku średnia 39 lat (od 19 do 70 lat), (Tab.1). Pacjenci nie byli zakwalifikowani do terapii przeciwwirusowej związanej z zakażeniem HCV. U wszystkich chorych rozpoznano przewlekle zapalenie wątroby typu C. Żaden chory nie miał rozpoznanej marskości wątroby, jak również nie obserwowano objawów dekompensacji wątroby.

Wszyscy zakażeni HIV-1 należeli do kategorii klinicznej A i otrzymywali HAART. Okres ich leczenia trwał od 1 do 5 lat.

Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób, 6 kobiet i 9 mężczyzn w wieku od 21 do 53 lat (średnia wieku 35 ± 2.7 lat).

HCV-RNA w surowicy pacjentów oznaczano metodą RT-PCR ze starterami reakcji swoistymi wobec niekodującego 5'-końcowego obszaru genomu (5'-UTR) wirusowego. Genotyp wirusa określano metodą bezpośredniego sekwencjonowania uzyskanego w reakcji PCR produktu.

Zakażenie HIV-1 rozpoznano na podstawie wykrycia we krwi przeciwciał anti-HIV-1 metodą ELISA oraz dodatniego wyniku testu Western-blot¹ (Cambridge Biotech Corporation, USA). Wiremią HIV określono metodą RT-PCR przy użyciu Cobas Amplicor HIS 1.5 (Ultra Sensitive)². Subpopulację i liczbę limfocytów CD3, CD4 i CD8 określono we krwi przy użyciu cy-

tometru przepływowego z użyciem aparatury Becton Dickinson².

Oznaczenie genotypu IL-28B

Polimorfizm rs12979860 oceniano na drodze sekwencjonowania produktu PCR obejmującego wyżej wymieniony SNP. Sekwencjonowanie wykonano metodą terminacji syntezy łańcucha z zastosowaniem gotowej mieszaniny reakcyjnej Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Izolację DNA z krwi pełnej pacjentów oraz RNA z osocza krwi wykonano na aparacie do automatycznej izolacji kwasów nukleinowych EasyMag (Bioerieux, Francja) techniką magnetyczną według protokołu producenta z wykorzystaniem gotowych odczynników tego producenta. Przed izolacją białka krwi zostały strawione na drodze inkubacji z Proteinazą K (Sigma-Aldrich). Reakcje PCR wykonywano przy użyciu polimerazy DNA *Taq* i mieszaniny dNTPs (EURx, Gdańsk), odwrotną transkrypcję – polimerazy *Tth* (Epicentre, USA). Produkty PCR przeznaczone do sekwencjonowania oraz produkty reakcji terminacji syntezy łańcucha oczyszczano z zastosowaniem gotowych zestawów odczynników „Gel-Out” oraz „Ex-Terminator” (DNA II Gdańsk). Sekwencjonowanie DNA wykonano na automatycznym sekwenatorze kapilarnym Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, USA). Uzyskane sekwencje analizowano przy użyciu programu BLAST (NCBI, USA).

Stężenie w surowicy sCD40 i sCD40L określono metodą ELISA przy zastosowaniu testów firmy eBioscience, Austria.

Po uprzednim zaakceptowaniu badania przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku chorzy oraz osoby z grupy kontrolnej wyrazili świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniach.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną przeprowadzono używając testów U Manna – Whitneya oraz współczynnika korelacji Spearmana. Poziom istotności określono w przypadku $p < 0.05$.

WYNIKI

Stężenie sCD40 wśród zakażonych HCV/HIV-1 oraz HCV było znamienne wyższe w porównaniu do osób zdrowych (25,7 i 23,2 v. 8,5 pg/ml, $p < 0.0002$ i $p < 0.001$). Również stężenia sCD40L było znamienne wyższe wśród badanych chorych w porównaniu do grupy kontrolnej (12,7 i 7,3 v. 0,79 ng/ml, $p < 0.0004$ i $p < 0.02$) (Ryc.1.). Nie stwierdzono istotnej różnicy

1 Western-blot testing was performed in Institute of Venerology, Medical University of Warsaw, Poland. Head: Dr Z. Seliborska.
2 Tests were performed in Molecular Diagnostics Laboratory in Hospital of Infectious Diseases, Warsaw, Poland. Head: Dr J. Stańczak.

stężenia sCD40 i sCD40L pomiędzy chorymi zakażonymi HCV (monoinfekcja) i HCV/HIV-1. Stężenia sCD40 i sCD40L nie zależały od rodzaju genotypu HCV (Tab.2).

Najniższa wiremia HCV była wśród chorych z genotypem CC w polimorfizmie rs12979860. Stwierdzono statystycznie istotne różnice wirerii HCV pomiędzy chorymi z genotypem CC, a CT ($p=0.003$) i pomiędzy CC, a TT ($p=0.004$), (Ryc.2).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wiracją HCV, a stężeniem sCD40i sCD40L.

Oceniając stężenie sCD40 i sCD40L w odniesieniu do polimorfizmu genów rs12979860, stwierdzono statystycznie istotne wyższe stężenie sCD40L wśród chorych z genotypem CC w porównaniu do pacjentów z genotypem Nie-CC (Tabela3)

Wśród chorych zakażonych HCV/HIV-1, chorzy z genotypem CC polimorfizmu rs12979860 mieli niższą wiramię w porównaniu do pacjentów z genotypem nie-CC, jednak różnica nie była statystycznie istotna (CC: 1906 IU/ml v. Nie-CC: 6534 IU/ml; $p=0.253$).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wartościami CD40, CD40L, a liczbą CD3+, CD4+, CD8+.

DYSKUSJA

Obserwowane w badaniach własnych wysokie stężenie sCD40 jak i sCD40L wśród zakażonych HCV i HCV/HIV wskazuje na prawdopodobną stymulację przez te wirusy syntezy badanych białek i jest to zgodne z obserwacjami innych autorów (4, 5). Nie stwierdzono różnicy stężeń sCD40 i sCD40L w grupach chorych zakażonych HCV i HCV/HIV. Wynik ten wskazuje, że współzakażenie HIV-1 pacjentów z zakażeniem HCV nie wpływa na wyższe stężenie sCD40 i sCD40L. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wiracją HIV a sCD40 i sCD40L. Jest to odmienny wynik od obserwacji *Donhauser* i wsp., którzy wśród zakażonych HIV-1 obserwowali zmniejszanie się stężenia sCD40L proporcjonalnie do spadku wirerii HIV (6). W badaniach własnych nie stwierdzono również wpływu polimorfizmu rs12979860 na wiramię HIV. *Sipsas* i wsp. wykazali korelację pomiędzy stężeniem sCD40L a liczbą CD4+ określaną w przedziałach powyżej 500 komórek/ml, pomiędzy 200/ml a 500/ml i poniżej 200/ml (5). W badaniach własnych nie obserwowano korelacji pomiędzy stężeniem sCD40 i sCD40L a liczbą CD4+. Również w badaniach *Kalayjian* i wsp. wśród zakażonych HIV nie wykazano zależności pomiędzy liczbą CD4+ a stężeniem sCD40L (7). Ponadto, *Davidson* i wsp. wykazali, że zakażenie HIV-1 może pobudzać, ale nie wpływa na poziom sCD40 i sCD40L (8).

Möller i wsp. w grupie zakażonych HCV obserwowali wysokie stężenia sCD40L. Stężenie to zmniejszało

się w trakcie terapii PEG-IFN i RBV i korelowało z wiracją HCV (4). W badaniach własnych nie obserwowano korelacji sCD40L z wiracją HCV oraz HIV. Jednak w badaniach własnych oceniono korelację pomiędzy wiracją przed leczeniem w odniesieniu do HCV oraz w różnych okresach terapii HAART w odniesieniu do wirerii HIV, a nie, jak wymienił badacz przed, w trakcie i po leczeniu. W badaniach własnych wiremia HIV była zazwyczaj bardzo mała lub niewykrywalna. Możliwe, że to był powód braku różnicy stężenia sCD40L i sCD40 pomiędzy chorymi zakażonymi HCV a pacjentami z koinfekcją HCV/HIV.

Badania *Möller* i wsp. wykazały zależność pomiędzy wysokim stężeniem sCD40L a skutecznością terapii przeciwwirusowej wśród przewlekle zakażonych HCV (4). W badaniach własnych stężenie sCD40L było statystycznie wyższe wśród chorych z genotypem CC w porównaniu do chorych z genotypem nie-CC genu rs12979860. Genotyp ten uznawany jest za predyktor skutecznej terapii przeciwwirusowej zakażenia HCV. W badaniach własnych wysokie stężenie sCD40L jest statystycznie wyższe wśród chorych z genotypem CC rs12979860, ale nie koreluje z wiracją HCV. Wynik ten może wskazywać, że synteza CD40L w okresie pobudzenia związanego z zakażeniem HCV lub HCV/HIV-1 jest większa u chorych z CC rs12979860. Nie jest to równoznaczne z przyjęciem wysokiego stężenia sCD40L jako wskaźnika dobrej odpowiedzi na leczenie związane z zakażeniem HCV czy też HIV. Wynik ten stanowi przesłankę do określenia polimorfizmu rs12979860 i oceny sCD40L i po leczeniu zakażonych HCV oraz przed i w trakcie terapii antyretrowirusowej zakażonych HIV.

Zakażenie HCV wpływa na wzrost stężenia sCD40, który może hamować syntezę endogennych interferonów. Z drugiej strony sCD40L aktywuje receptor CD40, który pobudza system STAT, będący niezależną od IFN drogą obrony przeciwwirusowej (1). Wysokie stężenie CD40L uruchamiające działanie przeciwwirusowe może prowadzić do spontanicznej eliminacji HCV (1, 9).

Obserwowana w badaniach własnych niska wiremia HCV wśród chorych z genotypem CC rs12979860 na prawdopodobieństwo spontanicznej eliminacji HCV, szczególnie wśród chorych zakażonych HCV/HIV (10).

Pobudzenie receptora CD40 ma kluczowe znaczenie w aktywacji procesów autoimmunizacyjnych (11). Stwierdzone w badaniach własnych wysokie stężenia sCD40 i sCD40L mogą tłumaczyć często obserwowane odczyny autoimmunizacyjne wśród zakażonych przewlekle HCV.

WNIOSKI

Wśród pacjentów przewlekle zakażonych HCV i HCV/HIV-1 występuje wysokie stężenie sCD40 i sCD40L. Wysokie stężenie sCD40L koreluje z występowaniem genotypu CC rs12979860, co może być wskaźnikiem skutecznej odpowiedzi przeciwwirusowej związanej z zakażeniem HCV. Stężenie sCD40, sCD40L nie zależy od genotypu wirusa, wiremii HCV i HIV oraz liczby limfocytów CD3+, CD4+ i CD8+.

Otrzymano: 15.10.2013 r.

Zaakceptowano do druku: 15.12.2013 r.

Adres do korespondencji:

Tadeusz Wojciech Łapiński
15-134 Białystok, ul. Żurawia 14
E-mail: twlapinski@wp.pl