

На правах рукописи

ЕЛЕЗОВ ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ (CXCR3, CCR6 и CD38)
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ
ГЕПАТИТОМ С**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

**Санкт-Петербург
2015**

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»

Научный руководитель:

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор

Официальные оппоненты:

Калинина Наталия Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунодиагностики и иммунокоррекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2015 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10 и на сайте: <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Новикова Лидия Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Хронический вирусный гепатит С представляет серьезную проблему для современного здравоохранения. В мире насчитывается более 185 миллионов человек, инфицированных вирусным гепатитом С [Mohd Hanafiah K., 2013]. В Российской Федерации за период с 2000 по 2010 год заболеваемость хроническим вирусным гепатитом С увеличилась вдвое и составила 40,9 случаев на 100 тысяч населения [Покровский В.И., 2011], в 2013 году заболеваемость составила 39,2 случаев на 100 тысяч населения.

Для вирусного гепатита С характерны высокая частота хронизации (60–80%), длительное бессимптомное течение, развитие у больных цирроза печени (20–30%), тяжёлых внепечёночных осложнений, гепатоцеллюлярной карциномы (4–8%), являющейся причиной направления пациентов на трансплантацию печени [Marcellin P., 2002; Lavanchy D., 2009]. На данный момент вакцина против вируса гепатита С не разработана. При применении стандартной терапии препаратами пегилированного интерферона и рибавирина выздоровление наступает только в части случаев, а лечение с использованием современных ингибиторов протеаз, хотя и является более эффективным, но остается достаточно дорогостоящим и также не позволяет добиться выздоровления у всех больных [Cashman S.B., 2014].

Иммунопатогенез хронического вирусного гепатита С, несмотря на значительные усилия, приложенные к его изучению, и некоторые полученные успехи, остается до сих пор окончательно не ясен и требует проведения дальнейших исследований с целью установления причин возникновения персистенции вируса и определения предполагаемых точек приложения медикаментозной терапии.

В последнее время интенсивно изучается роль иммунной системы в механизме формирования персистенции вируса гепатита С. Этот вирус способен эффективно ускользать от иммунного надзора организма хозяина с дальнейшим развитием хронической инфекции. При хроническом вирусном гепатите С выражен как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Для контроля инфекции необходима активация адаптивного иммунного ответа. Существенную роль в элиминации вируса при этом играет Т-клеточное звено. Однако, в большинстве случаев оно оказывается недостаточно эффективным при первичной реакции на инфекцию [Semmo N., 2007; Racanelli V., 2011].

Вирус гепатита С способен ослаблять действие адаптивного иммунного ответа несколькими способами. К основным из них относятся следующие: возникновение мутаций, позволяющих вирусу уйти от действия цитотоксических клеток и нейтрализующих антител, возникновение анергии цитотоксических Т-клеток с нарушением процессов клеточной активации, нарушение функций Т-эффекторов посредством влияния на Т-регуляторные клетки и Т-хелперы 1, выполняющие регуляторные функции, ослабление регуляторного баланса между костимулирующими, про- и антиапоптотическими молекулами [Larrubia J.R., 2014]. Также при хроническом вирусном гепатите С наблюдаются значительные нарушения в системе хемокинов [Жданов К.В., 2008; Арсентьева Н.А., 2012; Сысоев К.А., 2013], имеет место как изменение экспрессии хемокинов, так и экспрессии хемокиновых рецепторов на различных клетках иммунной системы, что

влияет на привлечение популяций лимфоцитов в печень и участие их в формировании очага воспаления [Brass A., 2014].

Если при хроническом вирусном гепатите С содержание основных популяций лимфоцитов периферической крови изучено достаточно полно [Лобзин Ю.В., 2007; Никитин В.Ю., 2009], то субпопуляционный состав лимфоцитов исследован крайне мало. Так, ничего не известно о содержании субпопуляций В-лимфоцитов на основании экспрессии CD27 и CD38, субпопуляций цитотоксических и хелперных Т-клеток памяти на основании экспрессии CD62L, CD45RA, CD27 и CD28, Т-регуляторных клеток, экспрессирующих CD62L и HLA-DR, субпопуляций NK- и NKT-клеток.

В последнее время проводятся исследования экспрессии различных активационных маркеров на субпопуляциях лимфоцитов, а также распределения самих лимфоцитарных популяций периферической крови, которые становятся предметом пристального изучения в том числе при хроническом вирусном гепатите С, что в дальнейшем может внести вклад в понимание иммунопатогенеза заболевания и механизмов приводящих к персистенции вируса. В частности, крайне мало изученной остается экспрессия активационных молекул CXCR3, CCR6 и CD38 на различных популяциях лимфоцитов.

CXCR3 – хемокиновый рецептор, участвующий в привлечении лимфоцитов в ткани печени и ассоциированный с Th1 типом иммунного ответа. Наблюдается взаимосвязь между степенью воспаления и содержанием CXCR3⁺ Т-лимфоцитов, инфильтрирующих ткани печени. Кроме того, уровень лиганда CXCL10 этого рецептора в плазме крови коррелирует со степенью фиброза печени [Zeremski M., 2011].

CCR6 – хемокиновый рецептор, также участвующий в привлечении лимфоцитов в ткани печени и ассоциированный с Th17 типом иммунного ответа. Уровень его единственного лиганда CCL20 в плазме крови повышен при хроническом вирусном гепатите и увеличивается с возрастанием степени фиброза печени. Также отмечена взаимосвязь между содержанием CCR6⁺ Т-хелперов и степенью воспалительного процесса в печени [Northfield J.W., 2008].

CD38 – рецептор, в последнее время используемый в качестве активационного маркера Т-лимфоцитов в различных иммунологических исследованиях. Для В-лимфоцитов данный рецептор используется как маркер дифференцировки. Данные литературы по экспрессии CD38 на Т-лимфоцитах при хроническом вирусном гепатите С противоречивы.

Таким образом, представляется актуальным исследовать субпопуляционный состав основных типов лимфоцитов периферической крови и экспрессию на них молекул CD38, CXCR3 и CCR6 у больных хроническим вирусным гепатитом С и оценить данные иммунологические показатели в качестве прогностических критериев течения заболевания.

Цель исследования

Провести анализ изменений в содержании популяций и субпопуляций В-лимфоцитов, хелперных, цитотоксических и регуляторных Т-клеток, клеток памяти, NK- и NKT-клеток периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С, экспрессирующих молекулы CXCR3, CCR6 и CD38, и

определить наличие взаимосвязей с клинико-лабораторными показателями активности заболевания.

Задачи исследования

1. Определить относительное и абсолютное содержание субпопуляций В-лимфоцитов, хелперных, цитотоксических и регуляторных Т-клеток, клеток памяти, НК- и НКТ-клеток в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С.
2. Исследовать особенности субпопуляций В-лимфоцитов, хелперных, цитотоксических и регуляторных Т-клеток, клеток памяти, НК- и НКТ-клеток, экспрессирующих молекулы CXCR3, CCR6 и CD38, в периферической крови практически здоровых и больных хроническим вирусным гепатитом С.
3. Оценить взаимосвязь между содержанием проанализированных типов клеток периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С, экспрессирующих активационные маркеры CXCR3, CCR6 и CD38, и клинико-лабораторными показателями активности заболевания.

Научная новизна

Впервые в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С выявлено повышенное содержание субпопуляций покоящихся CXCR3⁺ В-клеток памяти, активированных зрелых CXCR3⁺ В-клеток, «дубль негативных» CXCR3⁺ В-клеток и сниженное содержание транзитных В-клеток. Кроме того, при этой форме заболевания установлено повышенное количество субпопуляций CD28⁺CD27⁻ и CD28⁺CD27⁺ эффекторных Т-хелперов памяти, CD28⁺CD27⁺ «терминально-дифференцированных» эффекторных Т-хелперов памяти, CD62L⁻ Т-регуляторных клеток, CXCR3⁺CCR6⁻ клеток среди эффекторных Т-хелперов памяти, CD38⁺ клеток среди НК и НКТ-лимфоцитов, а также сниженное содержание субпопуляций CXCR3⁻CCR6⁺ клеток среди эффекторных Т-хелперов памяти и CXCR3⁻CCR6⁻ клеток среди «терминально-дифференцированных» эффекторных Т-хелперов памяти. Выявлено, что у больных хроническим вирусным гепатитом С с 1 генотипом вируса отмечается повышенное содержание В-клеток памяти и сниженное В2-клеток по сравнению с группой больных, пораженных не-1 генотипом вируса. Установлены корреляционные связи между уровнем вирусной нагрузки и содержанием субпопуляций В-клеток, экспрессирующих CXCR3, относительным содержанием CD38⁺, CXCR3⁺HLA-DR⁻ и CXCR3⁻CD38⁺ клеток среди Т-хелперов, а также между уровнем АЛТ/АСТ и относительным содержанием CXCR3⁺CD38⁻ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов. При хроническом вирусном гепатите С выявлена тенденция к увеличению количества CXCR3⁺V1-, CXCR3⁺V2-клеток и В2-клеток, а также снижению содержания субпопуляций CXCR3⁻CCR6⁻ Т-хелперов и В-клеток памяти по мере развития стадий фиброза печени. Впервые установлена выраженная отрицательная корреляционная зависимость между экспрессией молекул CD38 и CXCR3 на Т-хелперах как у практически здоровых лиц, так и у больных хроническим вирусным гепатитом С.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В работе раскрываются особенности течения иммунного ответа при хроническом вирусном гепатите С, что расширяет знания об иммунопатогенезе этого вирусного заболевания. При оценке содержания наиболее актуальных на сегодняшний день основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови у больных хроническим вирусным гепатитом С выявлено перераспределение субпопуляционного состава внутри основных популяций лимфоцитов – В- и Т-регуляторных лимфоцитов, хелперных и цитотоксических Т-клеток – и изменение экспрессии активационных маркеров CXCR3, CCR6 и CD38 на различных популяциях лимфоцитов.

В работе проведен поиск популяций лимфоцитов, уровень содержания которых в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С обладает прогностической значимостью с точки зрения определения активности заболевания. К ним в наибольшей степени относятся: CXCR3⁺ активированные зрелые В-лимфоциты и CXCR3⁺HLA-DR⁻ Т-хелперы по причине наличия корреляционной связи между содержанием данных субпопуляций и вирусной нагрузкой; CXCR3⁻CCR6⁻ Т-хелперы, CXCR3⁺ В2- и CXCR3⁺ В1-лимфоциты, В-клетки памяти и В2-клетки, в связи с достоверно значимыми различиями содержания этих субпопуляций у группы больных с отсутствием фиброза или слабым фиброзом (F0-F1) и группы с тяжелым фиброзом/циррозом печени (F3-F4); CXCR3⁺CD38⁻ цитотоксические Т-лимфоциты, содержание которых коррелирует с уровнем АЛТ и АСТ; В2-лимфоциты, содержание которых снижено у группы больных с 1 генотипом вируса, по сравнению с группой пациентов с не-1 генотипом.

Установлены границы нормальных значений содержания В-, хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов, хелперных и цитотоксических Т-клеток памяти, Т-регуляторных клеток, NK- и NKT-клеток, экспрессирующих CXCR3, CCR6 и CD38 в периферической крови, что может быть использовано при лабораторном иммунологическом обследовании как больных хроническим вирусным гепатитом С, так и в качестве контрольной группы при проведении исследований субпопуляционного состава лимфоцитов у больных с другими заболеваниями.

Методология и методы исследования

Работа выполнялась на клинической базе СПб ГБУЗ №30 «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина» в период 2012 – 2015 гг. Все исследования были одобрены комитетом по этике ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» и проведены в соответствии с принципами Хельсинской декларации.

Клинико-лабораторная характеристика больных хроническим вирусным гепатитом С. Объём проведённых исследований. Общая характеристика клинического материала

В рамках проведенного исследования всего было обследовано 63 человека в возрасте от 19 до 68 лет (49% мужчин, 51% женщин, средний возраст – 38,2±13,2 лет) с подтвержденным диагнозом «хронический вирусный гепатит С», не получавших стандартной терапии препаратами интерферона и рибавирина и не

инфицированных вирусом гепатита В и ВИЧ. Больные находились на амбулаторном наблюдении в СПб ГБУЗ №30 «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина». Диагноз устанавливался на основании обнаружения антител к вирусу гепатита С и выявления вирусной РНК методом ПЦР. В обследование были включены только пациенты, у которых анализ методом ПЦР выявил в крови наличие РНК вируса гепатита С.

В группу контроля входило 27 практически здоровых доноров в возрасте от 20 до 53 лет (58% мужчин, 48% женщин, средний возраст – $34,0 \pm 10,4$ лет), не инфицированных ВИЧ и вирусами гепатита В и С. Все обследованные лица проживали в Санкт-Петербурге, Ленинградской области или Северо-Западном регионе России.

Клинико-лабораторные исследования осуществлялись в лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» и лабораториях СПб ГБУЗ №30 «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина». Венозную кровь получали путем пункции периферической вены и собирали в вакуумные пробирки типа «Vacutainer» объема 5,0 мл с добавлением антикоагулянта K_3EDTA . Лабораторные исследования проводились в день взятия крови. Определение антител к вирусу гепатита С выполнялось с применением тест-системы «БЕСТ анти-ВГС» производства «Вектор-Бест» (Россия) методом иммуноферментного анализа. Определение вирусной нагрузки РНК-ВГС проводилось методом обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени. Применялась тест-система «АмплиСенс HCV-монитор-FRT» производства ЦНИИЭ (Россия). Генотипирование вируса гепатита С производилось с использованием тест-системы «АмплиСенс-50-R HCV-генотип» производства ЦНИИЭ (Россия). Исследования проводились на приборе Rotor Gene Q фирмы «Qiagen» (Нидерланды) согласно инструкции производителя. Фенотипирование популяций лимфоцитов осуществлялось методом проточной цитофлуориметрии на приборах BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США) в лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» (заведующий лабораторией профессор, д.м.н. Тотолян А.А.) и Navios™ (Beckman Coulter, США) отдела иммунологии ФГБНУ «НИИ экспериментальной медицины» (заведующий отделом профессор, д.м.н. Назаров П.Г.). Активность АЛТ и АСТ измерялась стандартными биохимическими методами.

При исследовании содержания субпопуляций В-лимфоцитов и экспрессии на них CXCR3 группа больных хроническим вирусным гепатитом С составила 59 человек, субпопуляций Т-хелперов и экспрессии на них CXCR3 и CCR6 – 63 человека, субпопуляций NK- и NKT-клеток – 26 человек. Для исследования остальных популяций лимфоцитов группа больных хроническим вирусным гепатитом С составила 29 человек. Группа контроля во всех случаях составила 27 человек.

При проведении корреляционного анализа между содержанием субпопуляций В-лимфоцитов и уровнем АЛТ и АСТ группа больных хроническим вирусным гепатитом С составила 44 человека, а для содержания субпопуляций Т-хелперов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6, – 48 человек. Для

остальных популяций лимфоцитов группа больных хроническим вирусным гепатитом С составила 24 человека.

При исследовании содержания субпопуляций В-лимфоцитов и экспрессии на них CXCR3 все больные хроническим вирусным гепатитом С были разделены на две группы – с 1 генотипом вируса (n=35) и не-1 генотипом (n=23), а при исследовании содержания субпопуляций Т-хелперов и экспрессии на них CXCR3 и CCR6 было также две группы обследованных – с генотипом вируса 1 (n=30) и не-1 генотипом (n=25). При анализе остальных популяций группа больных с 1 генотипом вируса составила 17 человек, с не-1 генотипом – 12 человек.

На основании того, что вирусная нагрузка менее 400000 Ме/мл считается предиктором благоприятного ответа на противовирусное лечение хронического гепатита С [Mangia A., 2008], были выделены две группы больных хроническим вирусным гепатитом С – с высокой (более 400000Ме/мл) и низкой (менее 400000Ме/мл) вирусной нагрузкой. При исследовании содержания субпопуляций В-лимфоцитов и экспрессии на них CXCR3 было обследовано 32 пациента с высокой вирусной нагрузкой и 27 с низкой вирусной нагрузкой, а при исследовании содержания субпопуляций Т-хелперов и экспрессии на них CXCR3 и CCR6 – 35 человек с высокой вирусной нагрузкой и 21 с низкой вирусной нагрузкой. При анализе остальных популяций группа больных с высокой вирусной нагрузкой составила 15 человек, с низкой вирусной нагрузкой – 14 человек.

Стадия фиброза печени оценивалась по шкале METAVIR (F0 – отсутствие фиброза, F1 – слабый фиброз, F2 – умеренный фиброз, F3 – тяжелый фиброз и F4 – цирроз). Больные хроническим вирусным гепатитом С на основании стадии фиброза печени были разделены на две группы: F0-F1 – с отсутствием фиброза (F0) или слабым фиброзом (F1); F2-F4 – с умеренным (F2), тяжелым фиброзом (F3) или циррозом печени (F4). При исследовании содержания субпопуляций В-лимфоцитов и экспрессии на них CXCR3 было выделено три группы больных – F0-F1 (n=27), F2 (n=12) и F3-F4 (n=10); при исследовании субпопуляций Т-хелперов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6, – также три группы больных – F0-F1 (n=31), F2 (n=12) и F3-F4 (n=13). При анализе остальных популяций лимфоцитов группа больных F0-F1 включала 17 человек, F2-F4 – 7 человек (F2 – 3 человека, F3 – 2 человека, F4 – 2 человека).

Процедура пробоподготовки для цитометрического исследования периферической крови

В данном исследовании анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном двумя диодными лазерами 488 и 638 нм с возможностью использовать до 8 моноклональных антител одновременно в одной пробирке, и проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США), оснащенном двумя диодными лазерами 488 и 633 нм с возможностью использовать до 6 моноклональных антител одновременно в одной пробирке. Моноклональные антитела могут быть конъюгированы со следующими флуорохромами: FITC, PE, ECD, PC5 или PC5,5, PC7, APC, APC-Alexa Fluor 700, APC-Alexa Fluor 750 и др.

На каждого обследованного приходилось 8 пробирок со следующими наборами моноклональных антител:

- 1) CD5-FITC/CD38-PE/CD27-PE-Cy7/CXCR3-APC/CD19-APC-Alexa Fluor 700/CD45-APC-Alexa Fluor 750
- 2) HLA-DR-FITC/CD38-PE/CD3-ECD/CCR6-PE-Cy7/CXCR3-APC/CD4-APC-Alexa Fluor 700
- 3) HLA-DR-FITC/CD38-PE/CD3-ECD/CCR6-PE-Cy7/CXCR3-APC/CD8-APC-Alexa Fluor 700
- 4) CD45RA-FITC/CD62L-PE/CD3-ECD/CCR6-PE-Cy7/CXCR3-APC/CD4-APC-Alexa Fluor 700
- 5) CD45RA-FITC/CD62L-PE/CD3-ECD/CCR6-PE-Cy7/CXCR3-APC/CD8-APC-Alexa Fluor 700
- 6) CD45RA-FITC/CD62L-PE/CD3-ECD/CD28-PE-Cy5/CD27-PE-Cy7/CD4-APC/CD8-APC-Alexa Fluor 700
- 7) HLA-DR-FITC/CD25-PE/CD62L-ECD/CD3-PE-Cy7/CD127-APC/CD4-APC-Alexa Fluor 700/CD45-APC-Alexa Fluor 750
- 8) CD16-FITC/CD38-PE/CD3-ECD/CD56-PE-Cy5,5/CCR6-PE-Cy7/CXCR3-APC/CD8-APC-Alexa Fluor 700

При помощи гистограммы распределения клеток по параметрам малоуглового (относительный размер клеток) и бокового (структура клеток) светорассеяния выделяли область лимфоцитов. Для корректного исключения из зоны анализа клеток, которые не соответствовали по размерам и структуре неповрежденным лимфоцитам (слипшиеся и разрушенные клетки), вводили двухпараметрическую гистограмму распределения клеток по малоугловому светорассеянию, где по одной из осей анализировали интегральный сигнал, а по другой – пиковый сигнал данного параметра. Для определения популяций В-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток область лимфоцитов выделяли при помощи гистограммы распределения клеток по параметру бокового светорассеяния и экспрессии молекулы CD45. Для каждого из образцов анализировали не менее 50000 лимфоцитов, отвечающих указанным выше условиям. Полученные результаты выражали в процентах и абсолютных значениях. Абсолютные значения были получены в одноплатформенной системе с помощью реагента FlowCount™ (Beckman Coulter, США) или двухплатформенной системе с использованием гематологического анализатора Pentra 60 (Horiba ABX, Франция).

Методы математической и статистической обработки

Математическую обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 (Beckman Coulter, США) и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Анализ результатов и статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Graph Pad Prizm 6.02, Graph Pad Prizm 5.0 (GraphPad Software, США) и MS Excel. Полученные в ходе проведенного исследования результаты приведены в виде медианы и процентилей 25-75% (Med (25; 75)). Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. При проведении корреляционного анализа использовался

непараметрический коэффициент парной ранговой корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. При хроническом вирусном гепатите С в периферической крови происходит перераспределение субпопуляционного состава В-лимфоцитов от транзиторных и наивных зрелых В-клеток в сторону активированных зрелых В-клеток, покоящихся В-клеток памяти и дубль негативных В-клеток, что сопровождается повышенной экспрессией CXCR3 на данных субпопуляциях.
2. При хроническом вирусном гепатите С в периферической крови происходит перераспределение субпопуляционного состава Т-хелперных лимфоцитов от наивных Т-хелперов и центральных Т-хелперов памяти в сторону эффекторных и «терминально-дифференцированных» Т-хелперных клеток памяти, что сопровождается повышенным содержанием CD62L негативных популяций перечисленных типов клеток и повышенной экспрессией CXCR3 на эффекторных Т-хелперах памяти.
3. По мере выраженности фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С в периферической крови происходит снижение содержания CXCR3⁻CCR6⁻ Т-хелперов, В-клеток памяти и повышение CXCR3⁺ V1-, CXCR3⁺ V2- и V2-клеток.
4. При хроническом вирусном гепатите С относительное содержание в периферической крови CXCR3⁺ активированных зрелых В-лимфоцитов, а также CXCR3⁺HLA-DR⁻ Т-хелперов коррелирует с уровнем вирусной нагрузки; относительное содержание CXCR3⁺CD38⁻ цитотоксических Т-лимфоцитов коррелирует с уровнем АЛТ и АСТ. У больных хроническим вирусным гепатитом С с 1 генотипом вируса наблюдается сниженное относительное содержание В2-клеток по сравнению с группой пациентов с не-1 генотипом вируса. Как у практически здоровых лиц, так и у больных хроническим вирусным гепатитом С наблюдается выраженная отрицательная корреляционная зависимость между экспрессией молекул CD38 и CXCR3 на Т-хелперных лимфоцитах периферической крови.

Степень достоверности и апробация результатов

О достоверности полученных результатов свидетельствуют достаточная выборка больных хроническим вирусным гепатитом С и группы контроля, непосредственное участие соискателя в планировании и выполнении всех этапов клинического и экспериментального исследования, систематизации полученных данных, использование адекватных методов статистической обработки.

По теме диссертационного исследования опубликованы 8 статей, 4 из них в научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикаций основных результатов диссертационных исследований.

Диссертация апробирована на заседании Ученого Совета ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» (15 апреля 2015 года). Материалы диссертации представлены и обсуждены на следующих научных форумах: Международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2013); Всероссийской конференции с

международным участием «Профилактическая медицина – 2013» (Санкт-Петербург, 2013); научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» (Санкт-Петербург, 2014); LXXV научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2014» (Санкт-Петербург, 2014), XV Всероссийского научного форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015).

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский Государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В результате обследования контрольной группы в количестве 27 человек с использованием метода многоцветной проточной цитофлуориметрии были определены границы нормальных значений содержания популяций и субпопуляций В-лимфоцитов, хелперных, цитотоксических, регуляторных Т-лимфоцитов периферической крови (таблицы 1 и 2).

Таблица 1. Содержание субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови у контрольной группы [Me (Q25 – Q75)]

Субпопуляции В-лимфоцитов периферической крови	Содержания клеток у группы контроля	
	Относительное содержание, %	Абсолютное содержание, 10 ⁶ /л
CXCR3 ⁺ клетки среди активированных зрелых В-клеток	28,31 (22,93; 35,91)	7,03 (3,53; 9,6)
CXCR3 ⁺ клетки среди покоящихся В-клеток памяти	28,92 (22,69; 36,02)	5,52 (3,79; 9,49)
CXCR3 ⁺ клетки среди наивных зрелых В-клеток	2,28 (1,44; 7,25)	114,1 (85,35; 141,7)
CXCR3 ⁺ клетки среди «дубль негативных» В-клеток	15,95 (12,78; 24,04)	3,68 (2,23; 6,01)
CXCR3 ⁺ клетки среди транзиторных В-клеток	1,81 (0,93; 4,55)	0,23 (0,07; 0,3)
CXCR3 ⁺ клетки среди В-клеток	5,12 (3,11; 8,94)	8,96 (5,88; 14,19)

Анализ субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С

Несмотря на то, что общее количество В-лимфоцитов (CD19⁺CD45⁺) периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С достоверно не отличалось (p=0,68) от группы контроля, при разделении В-лимфоцитов на субпопуляции В1-(CD5⁺CD19⁺), В2- (CD5⁻CD27⁻CD19⁺) и В-клеток памяти (CD27⁺CD19⁺) у больных хроническим вирусным гепатитом С было обнаружено

повышенное содержание В-клеток памяти в относительных ($p=0,037$) и абсолютных значениях ($p=0,007$) (таблица 3). Экспрессия CXCR3 различалась среди субпопуляций В-клеток у обеих групп. В наибольшей степени CXCR3 экспрессировали В-клетки памяти, а экспрессия на В1- и В2-клетках была сравнительно меньше и примерно одинакова у данных популяций. У больных хроническим вирусным гепатитом С по сравнению с группой контроля было определено повышенное количество всех трех субпопуляций В-клеток, экспрессирующих CXCR3 ($p<0,001$). В абсолютных значениях наибольшее количество CXCR3⁺ клеток принадлежало субпопуляции В-клеток памяти, затем субпопуляции В2-клеток и в наименьшей степени В1-клеткам.

Впервые при разделении В-лимфоцитов на основании экспрессии молекул CD27 и CD38 у больных хроническим вирусным гепатитом С было определено содержание транзиторных В-клеток (CD38^{bright}CD27), наивных зрелых В-клеток (CD38⁺CD27⁻), покоящихся В-клеток памяти (CD38⁻CD27⁺), активированных зрелых В-клеток (CD27⁺CD38⁺), «дубль негативных» В-клеток (CD38⁻CD27⁻) и субпопуляций этих клеток, экспрессирующих CXCR3. При хроническом вирусном гепатите С было выявлено перераспределение субпопуляционного состава В-лимфоцитов от наивных покоящихся В-клеток в сторону более дифференцированных популяций – «дубль негативных» В-клеток, покоящихся В-клеток памяти и активированных зрелых В-клеток. Содержание CXCR3⁺ клеток было также повышенным среди покоящихся В-клеток памяти ($p=0,017$) и активированных зрелых В-клеток ($p=0,001$).

Относительное содержание CD38⁺ клеток среди В-лимфоцитов (данная популяция включает транзиторные и наивные зрелые В-клетки) коррелировало с уровнем вирусной нагрузки у больных хроническим вирусным гепатитом С ($r=0,453$; $p=0,014$), а относительное содержания CD38⁺ клеток среди субпопуляций В1- ($r=-0,401$; $p=0,031$), В2- ($r=-0,538$; $p=0,003$) и В-клеток памяти ($r=-0,403$; $p=0,03$) обратно коррелировало с уровнем вирусной нагрузки. Вместе с тем, прослеживалась корреляционная связь между уровнем вирусной нагрузки и процентом «дубль негативной» субпопуляции среди В-лимфоцитов ($r=0,453$; $p=0,014$) и абсолютным ее содержанием ($r=0,461$; $p=0,012$).

Кроме того, были установлены корреляционные связи между уровнем вирусной нагрузки и содержанием CXCR3-экспрессирующих субпопуляций В-лимфоцитов: абсолютным количеством покоящихся CXCR3⁺ В-клеток памяти ($r=0,384$; $p=0,04$), CXCR3⁺ «дубль негативных» В-клеток ($r=0,398$; $p=0,033$); относительным количеством CXCR3⁺ клеток среди наивных зрелых В-клеток ($r=0,394$; $p=0,034$) и CXCR3⁺ клеток среди активированных зрелых В-клеток ($r=0,477$; $p=0,009$).

У группы больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой вирусной нагрузкой был определен сниженный процент CD38⁺ клеток среди В2-лимфоцитов ($p=0,008$) по сравнению с группой с низкой вирусной нагрузкой, а также повышенный процент CXCR3⁺CD38⁻ клеток среди В-лимфоцитов ($p=0,034$). Наблюдалось повышенное содержание относительного количества «дубль негативных» клеток среди В-лимфоцитов ($p=0,042$), а также их абсолютного количества ($p=0,015$). Кроме того, абсолютное количество CXCR3⁺

покоящихся В-клеток памяти у группы больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой вирусной нагрузкой также было повышенным ($p=0,047$).

При разделении группы больных хроническим вирусным гепатитом С по генотипу вируса было установлено, что у группы пациентов с 1 генотипом вируса отмечалось повышенное ($p=0,032$) содержание процента В-клеток памяти и сниженное В2-клеток ($p=0,009$) по сравнению с группой пациентов не-1 генотипа. Значимых корреляционных взаимосвязей между уровнем АЛТ/АСТ и содержанием субпопуляций В-лимфоцитов не было выявлено.

Таблица 2. Содержание субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови у контрольной группы [Me (Q25 – Q75)]

Субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови	Содержания клеток у группы контроля	
	Относительное содержание, %	Абсолютное содержание, $10^6/л$
CXCR3 ⁺ клетки среди Т-хелперов	33,16 (28,61; 39,73)	282 (217; 429)
CCR6 ⁺ клетки среди Т-хелперов	31 (24,41; 37,41)	252 (189; 320)
CD38 ⁺ клетки среди Т-хелперов	55,51 (46,29; 64,74)	416 (355; 603)
CXCR3 ⁺ TCM-клетки среди Т-хелперов	16,2 (14,55; 19,33)	117 (102,1; 181,6)
CXCR3 ⁺ TEM-клетки среди Т-хелперов	15,1 (11,33; 18,39)	113,6 (82,35; 161,9)
CXCR3 ⁺ TEMRA-клетки среди Т-хелперов	0,79 (0,53; 1,37)	5,2 (3,8; 10,58)
CCR6 ⁺ TCM-клетки среди Т-хелперов	15,2 (12,1; 18,51)	108 (94,84; 146,8)
CCR6 ⁺ TEM-клетки среди Т-хелперов	13,7 (9,77; 16,52)	94,09 (73,72; 148,9)
CCR6 ⁺ TEMRA-клетки среди Т-хелперов	0,35 (0,23; 0,42)	2,59 (2,04; 3,57)
CD62L ⁺ Т-регуляторные клетки среди Т-хелперов	7,28 (5,95; 8,55)	47,08 (41,38; 59,56)
CD62L ⁻ Т-регуляторные клетки среди Т-хелперов	1,37 (1,09; 1,7)	9,91 (7,28; 13,88)
CXCR3 ⁺ клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	60,66 (54,62; 69,47)	224 (203; 316)
CCR6 ⁺ клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	7,67 (5,18; 13,3)	28 (20; 53)
CD38 ⁺ клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	39,84 (36,87; 53,1)	178 (135; 233)
CXCR3 ⁺ TCM-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	81,76 (75,36; 85,25)	38,71 (30,09; 62,76)
CXCR3 ⁺ TEM-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	74,66 (67,49; 79,3)	66,61 (39,58; 102,4)
CXCR3 ⁺ TEMRA-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	58,72 (47,44; 67,61)	60,64 (35,1; 101,9)
CCR6 ⁺ TCM-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	18,03 (9,83; 22,75)	4,19 (1,93; 6,94)
CCR6 ⁺ TEM-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	33,12 (20,72; 45,35)	20,58 (12,77; 33,85)
CCR6 ⁺ TEMRA-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	11,06 (7,39; 18,07)	2,98 (1,74; 6,78)

Таблица 3. Характеристика изменений иммунофенотипа популяций и субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С

Популяции/субпопуляции В-лимфоцитов периферической крови	Изменение содержания клеток у больных ХВГС по сравнению с группой контроля	
	Относительное содержание	Абсолютное содержание
В-лимфоциты	—	—
В1 (CD5 ⁺ CD19 ⁺) среди В-клеток	—	—
В2 (CD5 ⁻ CD27 ⁻ CD19 ⁺) среди В-клеток	—	—
В-клетки памяти (CD27 ⁺ CD19 ⁺) среди В-клеток	↑	↑↑
Активированные зрелые клетки (CD27 ⁺ CD38 ⁺) среди В-клеток	—	↑
Покоящиеся клетки памяти (CD38 ⁻ CD27 ⁺) среди В-клеток	—	—
Наивные зрелые клетки (CD38 ⁺ CD27 ⁻) среди В-клеток	↓	—
«Дубль негативные» клетки (CD38 ⁻ CD27 ⁻) среди В-клеток	↑	↑
Транзиторные клетки (CD38 ^{bright} CD27 ⁻) среди В-клеток	↓↓↓	↓↓
CXCR3 ⁺ клетки среди В-клеток	↑↑↑	↑↑↑
CXCR3 ⁺ клетки среди В1-клеток	↑↑↑	↑↑↑
CXCR3 ⁺ клетки среди В2-клеток	↑↑↑	↑↑↑
CXCR3 ⁺ клетки среди В-клеток памяти	↑↑↑	↑↑↑
CXCR3 ⁺ клетки среди активированных зрелых В-клеток	↑↑	↑↑↑
CXCR3 ⁺ клетки среди покоящихся В-клеток памяти	↑	↑↑
CXCR3 ⁺ клетки среди наивных зрелых В-клеток	↑	—
CXCR3 ⁺ клетки среди «дубль негативных» В-клеток	—	↑↑
CXCR3 ⁺ клетки среди транзиторных В-клеток	—	↓

Примечание:

↑ – повышенное содержание по сравнению с нормой

↓ – сниженное содержание по сравнению с нормой

«—» – отсутствие отличий от нормы

↑ P < 0,05; ↑↑ P < 0,01; ↑↑↑ P < 0,001

↓ P < 0,05; ↓↓ P < 0,01; ↓↓↓ P < 0,001

У подгруппы больных хроническим вирусным гепатитом С со степенями фиброза F0 и F1 наблюдалось повышенное содержание субпопуляции В клеток памяти ($p=0,015$) и сниженное В2-клеток ($p=0,012$) по сравнению с контрольной группой, но сниженное содержание субпопуляции В клеток памяти ($p=0,015$) и повышенное В2-клеток ($p=0,004$) по сравнению с подгруппой больных со степенью фиброза F3 и циррозом печени. Содержание субпопуляций CXCR3⁺V1- и CXCR3⁺V2-клеток у группы больных со степенями фиброза F0 и F1 было сниженным по сравнению с группой со степенью фиброза F3 и циррозом печени ($p=0,05$; $p=0,027$). Наблюдалась тенденция к увеличению количества CXCR3⁺V1- и CXCR3⁺V2-клеток по мере роста степени фиброза.

Анализ субпопуляционного состава Т-хелперных лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С

У больных хроническим вирусным гепатитом С общее содержание Т-хелперов (CD4⁺CD8⁻CD3⁺CD45⁺) было достоверно повышенным ($p=0,015$) по сравнению с группой контроля (таблица 4). Было выявлено перераспределение содержания субпопуляций лимфоцитов от наивных Т-хелперов (CD62L⁺CD45RA⁺) и центральных Т-хелперных клеток памяти (CD62L⁺CD45RA⁻) в сторону повышения содержания эффекторных (CD62L⁻CD45RA⁻) и «терминально-дифференцированных» эффекторных клеток памяти (CD62L⁻CD45RA⁺). При дальнейшей дифференцировке популяций Т-хелперных клеток памяти с использованием молекул CD27 и CD28 было определено повышенное содержание субпопуляций CD28⁺CD27⁺ и CD28⁺CD27⁻ эффекторных и «терминально-дифференцированных» эффекторных клеток памяти.

Внутри каждой из популяций Т-хелперов памяти отмечалось сниженное количество клеток с фенотипом CXCR3⁻CCR6⁺ у больных хроническим вирусным гепатитом С. Среди эффекторных Т-хелперных клеток памяти было определено повышенное ($p=0,016$) количество субпопуляции CXCR3⁺CCR6⁻ клеток. В популяции TEMRA-хелперов определено увеличенное количество клеток фенотипа CXCR3⁻CCR6⁻ ($p=0,013$). В абсолютных значениях было определено сниженное количество клеток субпопуляции CXCR3⁻CCR6⁻ наивных Т-хелперов и увеличенное содержание всех субпопуляций эффекторных и «терминально-дифференцированных» эффекторных Т-клеток памяти. У больных хроническим вирусным гепатитом С определен повышенный процент субпопуляций CXCR3⁺ ($p<0,001$), CCR6⁺ Т-хелперов ($p=0,018$) и сниженный процент CD38⁺ Т-хелперов ($p=0,021$), также наблюдалось повышенное количество субпопуляций CXCR3⁺ Т-хелперных лимфоцитов – CXCR3⁺CCR6⁻ и CXCR3⁺CCR6⁺, а также сниженное количество процента CXCR3⁻CCR6⁻ относительно общих Т-хелперов ($p<0,001$). Кроме того, у больных хроническим вирусным гепатитом С определено повышенное количество субпопуляций CXCR3⁺ Т-хелперных лимфоцитов – CXCR3⁺CD38⁻ ($p<0,001$) и CXCR3⁺CD38⁺ ($p<0,05$), а также сниженное количество процента CXCR3⁻CD38⁺ клеток относительно Т-хелперов ($p<0,001$).

Таблица 4. Характеристика изменений иммунофенотипа популяций и субпопуляций хелперных Т-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С

Популяции/субпопуляции хелперных Т-лимфоцитов периферической крови	Изменение содержания клеток у больных ХВГС по сравнению с группой контроля	
	Относительное содержание	Абсолютное содержание
Т-хелперные лимфоциты	–	↑
CXCR3 ⁺ клетки среди Т-хелперов	↑↑↑	↑↑↑
CCR6 ⁺ клетки среди Т-хелперов	↑	↑
CD38 ⁺ клетки среди Т-хелперов	↓	–
Т-регуляторные клетки среди Т-хелперов	–	–
CD62L ⁺ Т-регуляторные клетки среди Т-хелперов	↓↓↓	–
CD62L [–] Т-регуляторные клетки среди Т-хелперов	↑↑↑	↑↑↑
HLA-DR ⁺ Т-регуляторные клетки среди Т-хелперов	–	–
N-клетки (CD62L ⁺ CD45RA ⁺) среди Т-хелперов	↓↓↓	↓
TCM-клетки (CD62L ⁺ CD45RA [–]) среди Т-хелперов	↓	–
TEM-клетки (CD62L [–] CD45RA [–]) среди Т-хелперов	↑↑↑	↑↑↑
TEMRA-клетки (CD62L [–] CD45RA ⁺) среди Т-хелперов	↑↑↑	↑↑↑
CXCR3 ⁺ TCM-клетки среди Т-хелперов	–	–
CXCR3 ⁺ TEM-клетки среди Т-хелперов	↑↑↑	↑↑↑
CXCR3 ⁺ TEMRA-клетки среди Т-хелперов	–	↑
CCR6 ⁺ TCM-клетки среди Т-хелперов	↓↓	–
CCR6 ⁺ TEM-клетки среди Т-хелперов	↑	↑↑
CCR6 ⁺ TEMRA-клетки среди Т-хелперов	–	–

Примечание:

↑ – повышенное содержание по сравнению с нормой

↓ – сниженное содержание по сравнению с нормой

«–» – отсутствие отличий от нормы

↑ P < 0,05; ↑↑ P < 0,01; ↑↑↑ P < 0,001

↓ P < 0,05; ↓↓ P < 0,01; ↓↓↓ P < 0,001

У группы больных хроническим вирусным гепатитом С по сравнению с группой контроля количество общих Т-регуляторных клеток и HLA-DR⁺ Т-регуляторных клеток достоверно не различалось по сравнению с группой контроля. Определено повышенное абсолютное и относительное содержание субпопуляции CD62L⁻ Т-регуляторных клеток ($p < 0,001$) и сниженный процент субпопуляции CD62L⁺ Т-регуляторных клеток ($p < 0,001$) относительно Т-хелперов.

У группы больных хроническим вирусным гепатитом С установлены прямые корреляционные связи между уровнем вирусной нагрузки и относительным содержанием HLA-DR⁺ клеток среди Т-хелперов ($r = 0,444$; $p = 0,016$), CXCR3⁺ клеток среди TEMRA-хелперов ($r = 0,406$, $p = 0,029$) и CCR6⁺ клеток среди TEMRA-хелперов ($r = 0,386$, $p = 0,039$). Обратные корреляционные связи определены между уровнем вирусной нагрузки и относительным содержанием CD38⁺ клеток среди Т-хелперов ($r = -0,417$; $p = 0,024$), CXCR3⁺HLA-DR⁻ клеток среди Т-хелперов ($r = -0,482$; $p = 0,008$), CXCR3⁻CD38⁺ клеток среди Т-хелперов ($r = -0,439$; $p = 0,017$), CXCR3⁻CCR6⁻ клеток среди Т-хелперов ($r = -0,356$, $p = 0,005$), CXCR3⁻CCR6⁻ клеток среди TEMRA-хелперов ($r = -0,414$, $p = 0,026$) и абсолютным количеством CXCR3⁻CCR6⁻ Т-хелперов ($r = -0,419$, $p = 0,024$).

При сравнении групп больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой и низкой вирусной нагрузкой было выявлено сниженное абсолютное ($p = 0,038$) и относительное ($p = 0,047$) количество субпопуляции CXCR3⁻CCR6⁻ Т-хелперов. Кроме того, определено повышенное относительное количество HLA-DR⁺ клеток среди Т-хелперов у группы больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой вирусной нагрузкой ($p = 0,04$). При исследовании субпопуляций «терминально-дифференцированных» Т-хелперов памяти было выявлено, что у группы больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой вирусной нагрузкой наблюдалось повышенное относительное количество субпопуляции CXCR3⁻CCR6⁺ клеток среди TEMRA-клеток ($p = 0,02$), а также субпопуляции CD28⁺CD27⁻ клеток ($p = 0,006$).

При корреляционном анализе содержания субпопуляций Т-хелперов и уровня АЛТ/АСТ у больных хроническим вирусным гепатитом С уровень АЛТ коррелировал только с процентным содержанием CD38⁺ клеток среди общего числа Т-хелперов ($r = 0,454$, $p = 0,034$).

У группы больных хроническим вирусным гепатитом С с F0-F1 было определено повышенное содержание субпопуляции CXCR3⁺CCR6⁻ клеток среди TEM-хелперов по сравнению с F2-F4 ($p = 0,036$), CXCR3⁻CCR6⁻ Т-хелперов по сравнению с группой F3-F4 ($p = 0,049$), а также CXCR3⁻CCR6⁺ Т-хелперов по сравнению с группой F2 ($p = 0,021$).

При сравнении содержания субпопуляций Т-хелперов у группы больных хроническим вирусным гепатитом С с 1 генотипом вируса и группы с не-1 генотипом не было выявлено значимых различий.

Была обнаружена сильная отрицательная корреляционная связь между процентом CXCR3⁺ клеток среди Т-хелперов и CD38⁺ клеток среди Т-хелперных лимфоцитов как у больных хроническим вирусным гепатитом С ($r = -0,747$; $p < 0,0001$), так и у группы контроля ($r = -0,679$; $p < 0,0001$), что предполагает связь

экспрессии молекул CD38 и CXCR3 между собой вне зависимости от наличия хронического вирусного гепатита С.

Анализ субпопуляционного состава цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С

Содержание цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+CD4^-CD3^+CD45^+$) было достоверно повышенным ($p=0,024$) у больных хроническим вирусным гепатитом С по сравнению с группой контроля (таблица 5). Было выявлено перераспределение субпопуляций лимфоцитов от наивных цитотоксических Т-лимфоцитов в сторону «терминально-дифференцированных» эффекторных Т-клеток памяти.

При дальнейшей дифференцировке популяций цитотоксических Т-клеток памяти с использованием молекул CD27 и CD28, как и для хелперных Т-лимфоцитов, у группы больных хроническим вирусным гепатитом С было выявлено повышенное содержание субпопуляций $CD28^+CD27^+$ и $CD28^+CD27^-$ эффекторных и «терминально-дифференцированных» эффекторных клеток памяти, которые обладают менее выраженными цитолитическими свойствами по сравнению с субпопуляцией $CD28^-CD27^-$. При использовании молекул CXCR3 и CCR6 не было выявлено значимых изменений в субпопуляционном составе, за исключением повышенного содержания популяций, экспрессирующих CXCR3: $CXCR3^+$ TEM-клеток ($p=0,01$) и $CXCR3^+$ TEMRA-клеток ($p=0,021$). У больных хроническим вирусным гепатитом С было выявлено перераспределение субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов в сторону клеток, экспрессирующих хемокиновый рецептор CXCR3, экспрессия же CXCR3-отрицательных субпопуляций не была повышенной. При сочетанном анализе различных активационных маркеров наиболее значимой при данном заболевании оказалась только комбинация CD38 и HLA-DR.

У группы больных хроническим вирусным гепатитом С установлены прямые корреляционные связи между уровнем вирусной нагрузки и относительным содержанием HLA-DR⁺ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=0,394$, $p=0,034$), $CD38^+HLA-DR^+$ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=0,399$, $p=0,032$) и $CXCR3^+CCR6^-$ клеток среди цитотоксических наивных Т-лимфоцитов ($r=0,441$, $p=0,017$). Обратная корреляционная связь определена между уровнем вирусной нагрузки и относительным содержанием $CD38^-HLA-DR^-$ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=-0,38$, $p=0,042$).

При сравнении групп больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой (более 400000 МЕ/мл) и низкой (менее 400000 МЕ/мл) вирусной нагрузкой у группы с высокой вирусной нагрузкой было определено повышенное относительное количество субпопуляции $HLA-DR^+CD38^+$ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов ($p=0,028$). При исследовании популяций клеток памяти у группы больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой вирусной нагрузкой установлено повышенное относительное количество $CXCR3^+CCR6^-$ клеток среди наивных цитотоксических Т-лимфоцитов ($p=0,028$) и сниженное относительное количество $CXCR3^-CCR6^+$ клеток среди наивных цитотоксических Т-лимфоцитов ($p=0,042$). Кроме того, у группы больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой вирусной нагрузкой наблюдалось

повышенное относительное количество CXCR3⁻CCR6⁻ клеток среди эффекторных цитотоксических Т-клеток памяти (p=0,014).

Таблица 5. Характеристика изменений иммунофенотипа популяций и субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С

Популяции/субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови	Изменение содержания клеток у больных ХВГС по сравнению с группой контроля	
	Относительное содержание	Абсолютное содержание
Цитотоксические Т-лимфоциты	–	↑
CXCR3 ⁺ клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	–	↑
CCR6 ⁺ клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	–	–
CD38 ⁺ клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	–	–
N-клетки (CD62L ⁺ CD45RA ⁺) среди CD8 ⁺ Т-клеток	↓	–
TCM-клетки (CD62L ⁺ CD45RA ⁻) среди CD8 ⁺ Т-клеток	–	–
TEM-клетки (CD62L ⁻ CD45RA ⁻) среди CD8 ⁺ Т-клеток	–	↑↑
TEMRA-клетки (CD62L ⁻ CD45RA ⁺) среди CD8 ⁺ Т-клеток	↑	↑↑
CXCR3 ⁺ TCM-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	–	–
CXCR3 ⁺ TEM-клетки среди CD8 ⁺ Т-клетки	–	↑
CXCR3 ⁺ TEMRA-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	–	↑
CCR6 ⁺ TCM-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	–	–
CCR6 ⁺ TEM-клетки среди CD8 ⁺ Т-клетки	–	–
CCR6 ⁺ TEMRA-клетки среди CD8 ⁺ Т-клеток	–	–

Примечание:

↑ – повышенное содержание по сравнению с нормой

↓ – сниженное содержание по сравнению с нормой

«–» – отсутствие отличий от нормы

↑ P < 0,05; ↑↑ P < 0,01; ↑↑↑ P < 0,001

↓ P < 0,05; ↓↓ P < 0,01; ↓↓↓ P < 0,001

У больных хроническим вирусным гепатитом С активность АЛТ обратно коррелировала с процентным содержанием CXCR3⁺ клеток (r=-0,438, p=0,041) и

CXCR3⁺CD38⁻ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=0,541$, $p=0,009$), а активность АСТ прямо коррелировала с процентным содержанием CD38⁺ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=0,481$, $p=0,027$) и обратно коррелировала с процентным содержанием CXCR3⁺ клеток ($r=-0,478$, $p=0,028$) и CXCR3⁺CD38⁻ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов ($r=-0,624$, $p=0,003$).

При сравнении содержания субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов у группы больных хроническим вирусным гепатитом С с 1 генотипом вируса и группы с вирусом не-1 генотипа не было выявлено значимых различий.

При исследовании содержания субпопуляций цитотоксических Т-клеток памяти у группы F0-F1 по сравнению с группой F2-F4 было определено повышенное относительное количество CXCR3⁺ клеток среди центральных клеток памяти ($p=0,009$) и сниженное относительное количество CXCR3⁻CCR6⁻ клеток среди центральных клеток памяти ($p=0,008$).

Анализ субпопуляционного состава НК- и НКТ-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С

Относительное и абсолютное содержание НК- и НКТ-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С достоверно не отличалось от группы контроля (таблица 6). Среди НК-клеток наблюдалось перераспределение в сторону повышения содержания субпопуляций с фенотипами CD56⁻CD16⁺ и CD56⁺CD16⁻. Относительное содержание CD38⁺ клеток среди НК- ($p<0,001$) и НКТ-лимфоцитов ($p=0,034$) было повышенным у больных хроническим вирусным гепатитом С по сравнению с группой контроля, абсолютное содержание CD38⁺ НК- и НКТ-лимфоцитов достоверно не отличалось между группами.

Процент CXCR3⁺CCR6⁻ клеток относительно НК-клеток был сниженным ($p=0,014$), а абсолютное содержание CXCR3⁻CCR6⁺ НК-клеток было повышенным ($p=0,014$) у группы больных хроническим вирусным гепатитом С. Экспрессия CCR6, в отличие от других клеточных популяций, была низкой на НК- и НКТ-клетках. Таким образом, наблюдалось перераспределение субпопуляций НК-клеток в сторону сниженного содержания CXCR3⁺ субпопуляции. У больных хроническим вирусным гепатитом С также было выявлено повышенное ($p=0,002$) содержание субпопуляции CXCR3⁺CD56^{bright} НК-клеток, которые, по данным литературы [Eisenhardt M., 2012], в большей степени, по сравнению с другими популяциями, мигрируют в ткани печени.

При сравнении групп больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой и низкой вирусной нагрузкой было выявлено сниженное относительное количество субпопуляции CXCR3⁻CCR6⁺ клеток среди НКТ-клеток у больных хроническим вирусным гепатитом С с высокой вирусной нагрузкой ($p=0,006$). Существенных взаимосвязей между содержанием субпопуляций НК- и НКТ-клеток и другими клиническими данными не было выявлено.

В результате проведенной работы выявлены изменения количественного содержания ряда малых популяций в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С (рисунок 1). Полученные данные о перераспределении субпопуляционного состава лимфоцитов и экспрессии активационных маркеров являются основой для более детального изучения роли

популяций лимфоцитов в иммунопатогенезе хронического вирусного гепатита С. Необходимо дальнейшее изучение внутрипеченочного содержания и функциональных свойств популяций CXCR3⁺ активированных зрелых В-клеток, CXCR3⁺ покоящихся В-клеток памяти, CXCR3⁺ «дубль негативных» В-клеток, CXCR3⁺ Т-хелперов, CCR6⁺ Т-хелперов, CXCR3⁺ Т-цитотоксических клеток, CXCR3⁺ CD56^{bright} NK-клеток и CD62L⁻ Т-регуляторных клеток.

Таблица 6. Характеристика изменений иммунофенотипа популяций и субпопуляций NK- и NKT-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С

Популяции/субпопуляции NK- и NKT-лимфоцитов периферической крови	Изменение содержания клеток у больных ХВГС по сравнению с группой контроля	
	Относительное содержание	Абсолютное содержание
NK-лимфоциты	–	–
CD56 ⁺ CD16 ⁺ клетки среди NK-лимфоцитов	↓	–
CD56 ⁺ CD16 ⁻ клетки среди NK-лимфоцитов	–	↑
CD56 ⁻ CD16 ⁺ клетки среди NK-лимфоцитов	↑↑	↑↑↑
CD38 ⁺ клетки среди NK-лимфоцитов	↑↑↑	–
CXCR3 ⁺ CCR6 ⁻ клетки среди NK-лимфоцитов	↓	–
CXCR3 ⁻ CCR6 ⁺ клетки среди NK-лимфоцитов	–	↑
CXCR3 ⁺ CD56 ^{bright} клетки среди NK-лимфоцитов	–	↑↑
NKT-лимфоциты	–	–
CD38 ⁺ клетки среди NKT-лимфоцитов	↑	–

Примечание:

↑ – повышенное содержание по сравнению с нормой

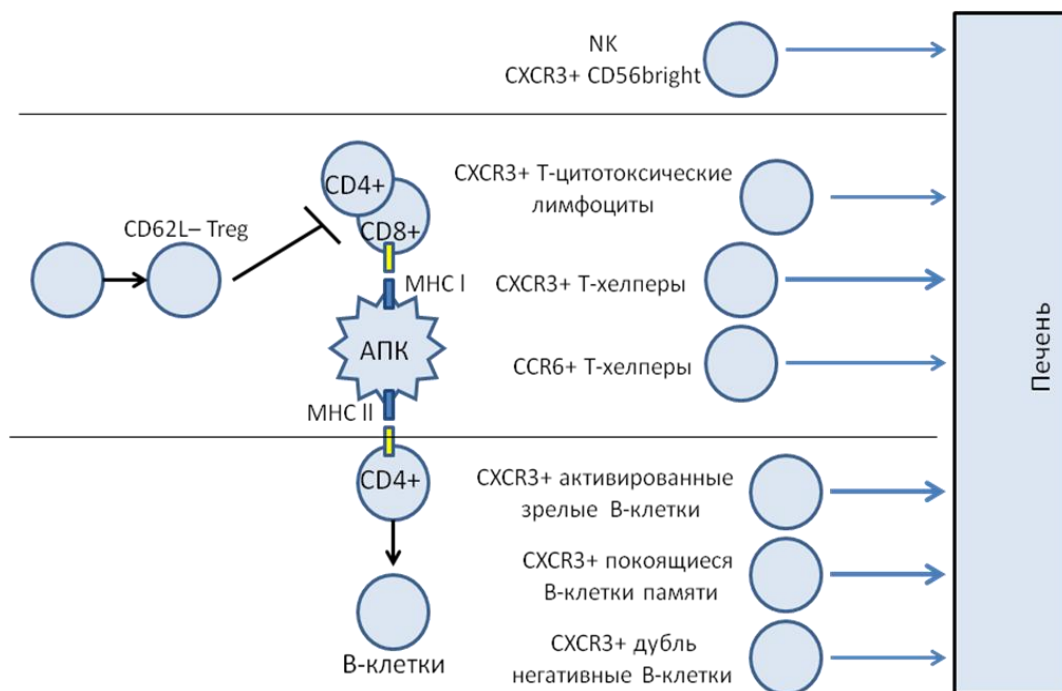
↓ – сниженное содержание по сравнению с нормой

«–» – отсутствие отличий от нормы

↑ P < 0,05; ↑↑ P < 0,01; ↑↑↑ P < 0,001

↓ P < 0,05; ↓↓ P < 0,01; ↓↓↓ P < 0,001

Рисунок 1. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С, содержание которых значительно изменяется по сравнению с группой контроля



Выводы

1. Субпопуляционный состав В-клеток периферической крови у больных хроническим вирусным гепатитом С имеет следующие особенности: высокое содержание СХСR3^+ В-клеток за счет активированных зрелых В-клеток, покоящихся В-клеток памяти и «дубль негативных» В-клеток; низкое содержание транзитных В-лимфоцитов.
2. Субпопуляционный состав хелперных Т-лимфоцитов периферической крови имеет следующие особенности у больных хроническим вирусным гепатитом С: низкое содержание наивных и центральных Т-хелперов сочетается с высоким содержанием эффекторных и «терминально-дифференцированных» эффекторных Т-хелперных клеток памяти; высокое содержание Т-хелперов, экспрессирующих СХСR3 или ССR6 , за счет соответствующих популяций эффекторных Т-хелперных клеток памяти, в сочетании с низким относительным количеством центральных ССR6^+ Т-хелперов; высокое содержание субпопуляции СD62L^- Т-регуляторных клеток.
3. Субпопуляционный состав цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови имеет следующие особенности у больных хроническим вирусным гепатитом С: низкое относительное содержание наивных Т-цитотоксических лимфоцитов, высокое количество «терминально-дифференцированных» эффекторных Т-цитотоксических клеток памяти и высокое абсолютное содержание эффекторных Т-цитотоксических клеток памяти.
4. Субпопуляционный состав НК-лимфоцитов периферической крови имеет следующие особенности у больных хроническим вирусным гепатитом С:

повышенное содержание популяции $CXCR3^+CD56^{bright}$ NK-клеток при сниженном содержании NK-клеток, экспрессирующих только CXCR3.

5. Как у практически здоровых лиц, так и у больных хроническим вирусным гепатитом С наблюдается выраженная отрицательная корреляционная зависимость между содержанием субпопуляций Т-хелперов периферической крови, экспрессирующих молекулы CD38 и CXCR3.

6. На поздних стадиях фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С в периферической крови снижается содержание субпопуляций $CXCR3^-CCR6^-$ Т-хелперов, В-клеток памяти и повышается содержание $CXCR3^+B1^-$, $CXCR3^+B2^-$ и В2-клеток.

Практические рекомендации

1. Полученные границы нормальных значений для популяций В-, Т-хелперных, Т-цитотоксических лимфоцитов, Т-хелперных и Т-цитотоксических клеток памяти, Т-регуляторных клеток, NK- и NKT-клеток, экспрессирующих CXCR3, CCR6, CD38, могут быть рекомендованы при проведении лабораторного иммунологического обследования как больных хроническим вирусным гепатитом С, так и в качестве контрольной группы при проведении исследований субпопуляционного состава у больных с другими заболеваниями.

2. При лабораторном обследовании больных хроническим вирусным гепатитом С для уточнения активности заболевания рекомендуется определять содержание $CXCR3^+$ активированных зрелых В-лимфоцитов ($CXCR3^+CD38^+CD27^+CD19^+$), $CXCR3^+B1$ -клеток ($CXCR3^+CD5^+CD27^-CD19^+$), $CXCR3^+B2$ -клеток ($CXCR3^+CD5^-CD27^-CD19^+$), В-клеток памяти и В2-клеток.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Елезов, Д.С. Популяции $CD4^+$ клеток памяти в периферической крови больных хроническим гепатитом С. Материалы международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» / Елезов Д.С., Арсентьева Н.А., Кудрявцев И.В. // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т.3. – №2. – С.126.

2. Кудрявцев, И.В. Анализ основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27, CD28, CD45RO и CD62L / Кудрявцев И.В., Елезов Д.С. // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т.7(16). – №2–3. – С.57–61.

3. Елезов, Д.С. Анализ субпопуляций Т-хелперов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и активационные маркеры CD38 и HLA-DR / Елезов Д.С., Кудрявцев В.И., Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т.3. – №4. – С.327–334.

4. Арсентьева, Н.А. Экспрессия хемокинового рецептора CXCR3 на субпопуляциях В-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом / Арсентьева Н.А., Кудрявцев И.В., Елезов Д.С., Семенов А.В., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. // Медицинская иммунология. – 2013. – Т.15. – №5. – С.471–476.

5. Семенов А.В. Особенности популяционного состава CXCR3 положительных лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С / Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – №6. – С.69–76.
6. Елезов, Д.С. Популяции В-клеток памяти периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С. Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» / Елезов Д.С., Арсентьева Н.А., Кудрявцев И.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т.4. – №1. – С.53.
7. Арсентьева, Н.А. Особенности популяционного состава CXCR3- и CCR6-положительных лимфоцитов периферической крови больных с HCV-инфекцией. Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» / Арсентьева Н.А., Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Семенов А.В. // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т.4. – №1. – С.65.
8. Елезов, Д.С. Анализ субпопуляций Т-регуляторных клеток периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С. Материалы XV всероссийского научного форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» / Елезов Д.С., Арсентьева Н.А., Кудрявцев И.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17. – №3s. – С.147.

Список сокращений и условных обозначений

- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- АСТ – аспартатаминотрансфераза
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ХВГС – хронический вирусный гепатит С
- АРС – allophycocyanin (аллофикоцианин)
- ССL – CC chemokines (СС-хемокины)
- ССР – CC chemokine receptors (рецептор СС-хемокинов)
- СХСL – CXC chemokines (СХС-хемокины)
- СХСR – CXC chemokine receptors (рецептор СХС-хемокинов)
- Су – cyanine (цианин)
- ЕСD – phycoerythrin-texas red (фикоэритрин-техасский красный)
- FITC – fluorescein isothiocyanate (флуоресцеин изотиоцианат)
- HLA – human leukocyte antigen (лейкоцитарный антиген человека)
- Н-клетки – наивные клетки (naïve cells)
- НК-клетки – natural killers (естественные киллерные клетки)
- НКТ-клетки – natural T killers (естественные киллерные Т-клетки)
- РЕ – phycoerythrin (фикоэритрин)
- РС – phycoerythrin-cyanine (фикоэритрин-цианин)

ТСМ-клетки – центральные Т-клетки памяти (T-central memory cells)

ТЕМ-клетки – эффекторные Т-клетки памяти (T-effector memory cells)

ТЕМРА-клетки – CD45RA⁺ эффекторные Т-клетки памяти (CD45RA⁺ T-effector memory cells)

Th – Т-хелперы