

Фавин

На правах рукописи

СЕЛЬКОВА
Мария Сергеевна

**Клинико-иммунологическая характеристика
хронического гепатита С
с учетом факторов противовирусного иммунитета**

14.01.09 – инфекционные болезни

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук



10 ОКТ 2013

Санкт-Петербург - 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «НИИ гриппа» МЗ РФ

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук профессор Эсауленко Елена Владимировна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук профессор профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ВИЧ-медицины Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова Минздрава России Антонова Тамара Васильевна

Доктор медицинских наук профессор профессор кафедры инфекционных болезней Государственного казенного военного образовательного учреждения высшего профессионального образования Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова Министерства обороны РФ Белозеров Евгений Степанович

Ведущая организация: ГБОУ ВПО Северо-Западный Медицинский Университет им. И.И. Мечникова Минздрава России

Защита диссертации состоится «15» октября 2013г. в 13⁰⁰ час на заседании диссертационного совета Д.208.090.02 при ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России в НИИ пульмонологии (197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, д.12)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России по адресу: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д.6-8

Автореферат разослан «11» сентября 2013г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Доктор медицинских наук профессор

Александров Альберт Леонидович

Актуальность темы

Проблема вирусных гепатитов с парентеральным путем заражения остается одной из самых актуальных в инфекционной патологии. Особого внимания заслуживает вирусный гепатит С, которым страдает приблизительно 150 млн. человек во всем мире.

По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно более 350 000 человек умирают от ассоциированных с ВГС болезней печени (Информационный бюллетень № 164 ВОЗ, июль 2012 г.). Чрезвычайно высока вероятность развития первичной гепатокарциномы (20% случаев хронических гепатитов) [Шахгильдян, И.В., 2003, Alter, H. J., 2005, Su F.H., 2011].

С тех пор как в 1989 году ВГС был идентифицирован, продолжается его интенсивное изучение. Успехи этиологической верификации вирусных гепатитов, в том числе определение ВГС, ограничило в последние годы их распространение при гемотрансфузиях, операциях и прочих медицинских манипуляциях, однако значительной группой риска остаются парентеральные потребители наркотиков [Palmeeter N.E., 2013]. При анализе путей возможного инфицирования следует учитывать также немедицинские процедуры (татуаж, пирсинг).

Отсутствие специфических мер профилактики наряду с высокой стоимостью противовирусной терапии и ее недостаточной эффективностью делает ХГС актуальной медицинской и социальной проблемой [De Compadri P., 2008, Asselah, T., 2011, Bittar C., 2013].

С момента выявления различных генотипов вируса предпринимались и предпринимаются до настоящего времени попытки определить зависимость клинической картины и эффективность терапии от определенного генотипа вируса и вирусной нагрузки [Jaz, V., 2011].

Практически отсутствуют данные о взаимосвязи изменений различных популяций иммунокомпетентных клеток пациентов в зависимости от генотипа вируса, вирусной нагрузки и характера изменений в ткани печени.

Гуморальные факторы специфического иммунитета при ХГС не играют протективную роль, а их определение имеет преимущественно диагностическое значение [Targ, A.W., 2012, Thimme, R., 2012]. Поэтому особое внимание привлекает изучение клеточных факторов иммунитета [Mondelli M.U., 2012]. При этом основную роль в механизмах элиминации вируса и развитии патологических процессов в печени отводят клеточным факторам иммунитета, в том числе врожденного, в частности, цитотоксическим клеткам, а также системе интерферонов [Guglietta S., 2009].

Недостаточно изучена при ХГС роль Т-регуляторных лимфоцитов, определяющих интенсивность иммунного ответа и ограничивающих иммунопатологические реакции в органах-мишенях.

Полученные данные, характеризующие содержание и функциональные особенности иммунокомпетентных клеток у пациентов с ХГС, могут иметь значение как для оценки прогноза заболевания, так и для разработки новых подходов к иммуноориентированной терапии.

Цель работы:

изучить роль цитотоксических клеток, системы интерферонов и Т-регуляторных лимфоцитов в патогенезе хронического гепатита С (ХГС).

Задачи:

1. Охарактеризовать клинико-биохимические особенности ХГС у пациентов с различными вариантами течения заболевания.
2. Определить этиологическую гетерогенность и уровень вирусной нагрузки у больных ХГС.
3. Оценить состояние интерферонового статуса у пациентов с различными вариантами течения ХГС.
4. Выяснить характер изменений содержания НКТ- и НК-клеток, в том числе их активированных форм у больных ХГС.
5. Уточнить роль Т-регуляторных лимфоцитов в прогрессировании ХГС.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У пациентов с различными вариантами течения ХГС снижено содержание активированных форм НК-клеток на всех стадиях заболевания. Содержание НКТ-клеток уменьшается по мере прогрессирования заболевания. ХГС сопровождается существенными изменениями интерферонового статуса, характеризующимися повышением сывороточного интерферона и снижением способности к продукции α/β - и γ -интерферонов лейкоцитами независимо от стадии заболевания.
2. При ХГС развитие фибротических изменений в ткани печени определяется иммуносупрессивными механизмами, связанными с Т-регуляторными лимфоцитами.
3. Для оценки тяжести и прогноза заболевания важное значение имеет сопоставление иммунологических параметров, в частности содержания и функциональной активности цитотоксических клеток, Т-регуляторных клеток, интерферонового статуса и биохимических параметров.

Научная новизна

Впервые на основании комплексной оценки содержания цитотоксических клеток установлено, что у пациентов с ХГС наблюдается снижение количества активированных форм НК-клеток. Получены новые данные, показывающие взаимосвязь повышения содержания Т-регуляторных клеток с прогрессированием фибротических изменений в ткани печени. Выявлено снижение способности к продукции эндогенных интерферонов, что может являться дополнительным патогенетическим обоснованием назначения интерферонотерапии при ХГС.

Теоретическая значимость работы

Показана возможная роль снижения цитотоксического потенциала НК-клеток в патогенезе ХГС. Установлено снижение функционально активированных НК-клеток ($CD3^+CD16^+CD56^+CD107a^+$) у пациентов с ХГС. Получены данные о взаимосвязи вирусной нагрузки с содержанием цитотоксических лимфоцитов и их функциональной активностью. Определено, что выраженность холестатического синдрома у пациентов ХГС связана с повышением содержания НКТ-клеток

(CD3⁺CD16⁺CD56⁺). Выявлено снижение способности к продукции эндогенных интерферонов, свидетельствующее о существенных изменениях неспецифической противовирусной резистентности у пациентов с различными вариантами течения ХГС. Установлено, что по мере прогрессирования заболевания увеличивается содержание Т-регуляторных клеток (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) в периферической крови пациентов, что может свидетельствовать о важной роли иммуносупрессивных механизмов в патогенезе ХГС и прогрессировании фибротических изменений в ткани печени.

Практическая значимость работы

Оценка содержания и функционального потенциала НК-клеток может служить важным иммунологическим критерием прогрессирования ХГС. Так, снижение содержания активированных НК-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD107a⁺) является одним из показателей неблагоприятного течения ХГС. Выявленные у пациентов ХГС существенные изменения интерферонового статуса, характеризующиеся снижением способности к продукции α/β - и γ -интерферонов лейкоцитами, могут служить дополнительным обоснованием для назначения интерферонотерапии. Определение содержания Т-регуляторных лимфоцитов позволяет оценить выраженность иммуносупрессивных механизмов у пациентов с ХГС, способствующих прогрессированию заболевания.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты работы внедрены в лечебно-диагностическую практику отделения экспериментальной терапии вирусных гепатитов ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ, ГКУЗ Ленинградской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», используются в учебном курсе для студентов V и VI курсов и слушателей на циклах постдипломного образования на кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ВИЧ-медицины ГБОУ ВПО «СПбГМУ им.акад. И.П.Павлова» МЗ РФ.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 3 статьи – в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендуемых ВАК РФ.

Апробация работы

Результаты работы доложены на VII Всероссийской научно-практической конференции "Вирусный гепатит – проблемы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики" (М, 2007), Международной конференции «Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями» (СПб, 2010), XIV Всероссийском научном форуме с международным участием им. акад. В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (СПб, 2011), Научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы инфекционной патологии – 2011» (СПб, 2011), V Междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Урогенитальные инфекции и репродуктивное здоровье: клинико-лабораторная диагностика и терапия» (СПб, 2012), Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 18 таблицами и 11 рисунками. В библиографический указатель включено 206 источника, из них 29 работ отечественных и 177 зарубежных авторов.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась на отделении экспериментальной терапии вирусных гепатитов ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. Иммунологические исследования проводились на базе лаборатории иммунологии с диагностикой СПИД ФГБУ «НИИИАГ им. Д.О.Отта» СЗО РАМН, в лаборатории молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ, молекулярно-биологические исследования на базе лаборатории молекулярной вирусологии и геной инженерии, биохимические исследования - в клинико-диагностической лаборатории специализированной клиники вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ.

В исследование был включен 81 пациент с диагнозом ХГС. Возраст пациентов составил от 20 до 62 лет (средний возраст - 34 (30/42) года, среди обследованных было 54 (66,7 %) мужчины и 27 (33,3%) женщин. Диагноз ХГС был подтвержден выявлением антител к ВГС и обнаружением РНК ВГС в сыворотке крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Группу сравнения оставили 42 здоровых донора, у которых было проведено исследование интерферонового статуса и у 20 пациентов определяли субпопуляционный состав лимфоцитов.

Клиническое наблюдение за больными включало в себя выяснение анамнеза заболевания, эпидемиологических данных, клинический осмотр с обследованием по системам и органам при поступлении на отделение и в динамике, оценку тяжести основного заболевания по стадиям и выраженности клинических проявлений, а также сопутствующих заболеваний и осложнений.

Для оценки тяжести течения и стадии ХГС использовались общепринятые лабораторные исследования: клинический анализ крови, активность АЛТ, АСТ, уровень билирубина, ЩФ, ГГТП.

Для оценки степени выраженности патологического процесса в печени у 68 пациентов использовали неинвазивные методы: фибротест (Fibrotest, FT)). Данный метод является экспертной системой (запатентованный алгоритм) пересчета биохимических показателей крови по специально разработанной статистической программе (Biopredictive, Houilles France).

Для определения NK- и NKT-клеток использовали моноклональные дифференцировочные антитела к поверхностным рецепторам CD3, CD16, CD56, CD107a (антитела к LAMP-белку - Lysosomal-associated membrane protein) (Vecton Dickinson, США); для исследования T-регуляторных клеток к антигенам CD4, CD25, CD127. Измерения проводились на проточном цитофлюориметре FACS Canto II (Vecton Dickinson, США) в соответствии с протоколами фирмы-производителя. Для

исследования накапливали данные о 50 000 событий. На точечном графике в координатах бокового и прямого светорассеяния оценивали локализацию лимфоцитов по морфологическим критериям. Данную область выделяли и анализировали с помощью точечного графика в координатах бокового светорассеяния и интенсивности флуоресценции, определяли локализацию лимфоцитов с фенотипом $CD3^-$ и $CD3^+$. Далее определяли относительное содержание NK-клеток ($CD3^+CD16^+CD56^+$), включая их активированные формы ($CD3^+CD16^+CD56^+CD107a^+$) и NKT-клетки ($CD3^+CD16^+CD56^+$). На точечном графике в координатах бокового светорассеяния и интенсивности флуоресценции определяли локализацию Т-лимфоцитов с иммунофенотипом $CD4^+$. Данную область выделяли и анализировали с помощью точечного графика в координатах интенсивности флуоресценции и определяли относительное содержание клеток с иммунофенотипом $CD25^{hi}CD127^{low}$, которые и представляли собой Т-регуляторные клетки. Абсолютное содержание отдельных иммунокомпетентных клеток оценивали исходя из общего количества лимфоцитов и относительного содержания определенных популяций клеток.

Оценку интерферонового статуса проводили биологическим методом в соответствии с рекомендациями, изложенными в пособии для врачей, рекомендованном МЗ России (2002 г.). Для индукции выработки лейкоцитами α/β -интерферона использовали вирус болезни Ньюкастл, для индукции γ -интерферона – стафилококковый энтеротоксин. Содержание интерферонов в сыворотке и супернатантах культур лейкоцитов после воздействия соответствующих индукторов оценивали по ингибированию цитопатического действия вируса везикулярного стоматита в отношении клеток карциномы легкого L-41.

Для статистической обработки полученных данных использовали несколько приложений, в том числе IBM SPSS и российскую свободно распространяемую разработку AtteStat. Характеристики выборок с нормальным распределением представлены в виде средних величин (M), стандартных отклонений (SD), минимального и максимального значения, для выборок с негауссовским распределением – в виде медианы (25%/75%). Для анализа качественных переменных использовали таблицы сопряженности и точный критерий Фишера. В случае количественных значений, учитывая мощность выборок, проверка статистических гипотез для двух независимых выборок проводилась при помощи U-теста Манна – Уитни. Для сравнения более двух независимых выборок использовали критерий Крускала-Уоллеса. Для зависимых выборок применяли тест Вилкоксона. Для всех использованных критериев различия считались статистически значимыми, если Р-значение было менее 0,05. Для определения силы связи использовали двухсторонний ранговый корреляционный анализ Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение.

У большинства обследованных нами пациентов причиной обращения в отделение послужило выявление антител к ВГС при скрининговом или профилактическом обследовании. При первичном обращении жалобы предъявляли лишь 33 пациента (40,7 %). Средний возраст пациентов составил 36,5 лет, что

позволяет говорить о том, что поражается в основном дееспособное население в репродуктивном возрасте. Это делает проблему ХГС актуальной и с социально-экономической точки зрения [Airoldi, J., 2006, Gardenal R.V., 2011]. Симптомы заболевания, регистрируемые у пациентов, носили неспецифический характер (жалобы на слабость, повышенную утомляемость, боли и тяжесть в правом подреберье) и не всегда вынуждали пациентов обращаться к врачу-инфекционисту. Основная причина обращения – случайное выявление антител к ВГС при профилактическом обследовании.

Особенности генетической гетерогенности возбудителя и уровень вирусной нагрузки у обследованных пациентов.

В последнее время активно обсуждается связь уровня вирусемии с клиническими проявлениями, а также с прогнозом и исходом заболевания [Блюм, Х.Е., 2005, Рахманова, А.Г., 2006]. При исследовании вирусной нагрузки у 42 человек (59,2%) было выявлено высокое содержание вирусной РНК в крови (>800000 МЕ/мл). У 40,8% пациентов определялся низкий уровень вирусной нагрузки (<800000 МЕ/мл, Ме для высокого уровня нагрузки – 2520000 МЕ/мл, Ме для низкого уровня – 210000 МЕ/мл). Все пациенты в последующем получали комбинированную противовирусную терапию. Нами установлено, что уровень вирусной нагрузки коррелировал с наличием жалоб у пациентов. Пациенты с высокой вирусной нагрузкой достоверно чаще предъявляли жалобы при первичном обращении (точный критерий Фишера, $p = 0,024$). Этот факт может иметь значение для назначения противовирусной терапии пациентам с ХГС. В настоящее время не вызывает сомнения, что раннее начало специфической комбинированной противовирусной терапии оказывает положительный эффект на исход заболевания независимо от первоначального уровня вирусной нагрузки у пациентов [Gupta, S., 2012].

Литературные данные по структуре генотипов вируса среди инфицированных ВГС противоречивы. Одни авторы указывают на преобладание 1b генотипа. По другим данным лидирующее место занимает 3a генотип [Львов, Д.К., 1997, Жданов, К.В., 2000]. Это может быть связано с изменением эпидемиологии ХГС, в частности, с тем, что в последнее время заболевание чаще регистрируется не у наркопотребителей, а у социально адаптированных лиц. Кроме того, на структуру генотипов может влиять очень развитая в последнее время миграция в крупные города, каким является Санкт-Петербург.

В нашем исследовании преобладали пациенты, инфицированные вирусом 1b генотипа ВГС (50,6%). У 2 пациентов определялся вирус 1a генотипа (2,5%), вирус 1b генотипа – у 41 (50,6%), вирус 2 генотипа у 3-х (3,7%), вирус 3a генотипа регистрировался у 32 пациентов (39,3%), сочетание вирусов 2-х генотипов было отмечено у 3 пациентов (3,7%): 1b и 1a - у 2-х пациентов, 1b и 3a - у одного пациента.

Клиническая и биохимическая характеристика обследованных пациентов.

По данным литературы клинические признаки поражения печени у большинства больных ХГС слабо выражены. Желтуха возникает редко, и, как правило, на терминальных стадиях заболевания (цирроз). У большей части пациентов при целенаправленном исследовании выявляется гепатомегалия. Симптомами, более характерными для цирротической стадии ХГС, является спленомегалия и наличие «сосудистых звездочек», а также отечно-асцитический синдром и синдром печеночно-клеточной недостаточности [Подымова, С.Д., 2005, Рахманова, А.Г., 2006].

При объективном клиническом обследовании у 60 пациентов (74,1%) была выявлена гепатомегалия, в 19,8% случаев сочетавшаяся со спленомегалией. Следует отметить, что у обследованных нами пациентов отсутствовала желтушность кожных покровов и признаки портальной гипертензии.

По литературным данным биохимические маркеры поражения печени у многих пациентов также могут быть маловыраженными [Майер, К.П., 2004, Серов В.В., Апросина З.Г., 2004].

При анализе лабораторных данных в нашем исследовании можно говорить об умеренной биохимической активности патологического процесса. Основным биохимическим синдромом при ХГС является цитолитический синдром.

Проведенное исследование показало, что уровень АЛТ в пределах нормы определялся у 12 человек (14,3%), выше нормы у 69 человек (85,7%). Нормальный уровень АЛТ чаще наблюдался у женщин, нежели у мужчин. Средний уровень АСТ составил 47 Ед/л. Однако, лишь у 53 человек (65,4%) активность этого ферменты была выше нормы, а у 28 человек оставалась нормальной (34,6%). Это подтверждает представления о том, что при определении выраженности цитолиза гепатоцитов более специфичным маркером является АЛТ. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что у большинства пациентов ХГС протекает с умеренно выраженным цитолитическим синдромом.

Повышенный уровень общего билирубина определялся у 20 пациентов (24,7%), а у 61 пациента оставался в пределах нормы. Уровень общего билирубина в среднем составил 15 мкмоль/л. Уровни ГГТП и ЩФ – 41 и 115 ммоль/л соответственно.

При статистическом анализе уровень билирубина слабо коррелировал со сроком инфицирования пациентов ($r=0,303$, $p=0,009$). Медиана предполагаемого срока инфицирования при повышенном уровне общего билирубина составляла 10 лет, для нормального уровня билирубина – 6,5 лет. Длительность заболевания также коррелировала с уровнем ГГТП ($r=0,312$, $p=0,023$). Уровень ГГТП также коррелировал с активностью АЛТ ($r=0,288$, $p=0,03$).

Полученные данные могут свидетельствовать о медленном прогрессировании холестатического синдрома по мере увеличения стажа заболевания.

У пациентов с нормальным уровнем активности АЛТ статистически чаще определяли и нормальный уровень общего билирубина ($p<0,05$).

Помимо биохимических показателей были также проанализированы результаты клинических анализов крови пациентов с ХГС. Было установлено, что у 26 пациентов (32,1%) наблюдалась тромбоцитопения, у 5 (6,2%) обследуемых отмечалась лейкопения, а у 3 пациентов (3,7%) – лейкоцитоз. У 31 пациента (38,3%) был выявлен относительный лимфоцитоз.

Таким образом, среди наиболее часто выявляемых отклонений в клиническом анализе крови можно отметить тромбоцитопению и относительный лимфоцитоз. Данные изменения при ХГС описаны в литературе. Так, тромбоцитопения объясняется аутоиммунной реакцией организма на тромбоциты, вследствие изменения вирусами антигенной структуры тромбоцитов [Dimitroulis D., 2012].

Относительное содержание лимфоцитов в клиническом анализе крови было статистически значимо связано с уровнем АЛТ ($p < 0,05$). У пациентов с нормальным относительным содержанием лимфоцитов уровень АЛТ был невысоким – 66 Ед/л, а у пациентов с относительной лимфопенией в клиническом анализе крови уровень АЛТ был существенно выше нормы, составив 105 Ед/л.

Это может свидетельствовать о перераспределении лимфоцитов и привлечении их в очаг поражения (печень) при прогрессировании заболевания.
Иммунологические параметры у пациентов с ХГС.

Наши данные подтверждают представление о том, что клинико-биохимические показатели у пациентов с ХГС в доцирротической стадии редко дают представление о характере течения заболевания, что требует привлечения иммунологических методов, отражающих особенности патогенеза заболевания. Основным фактором противовирусного иммунитета, в том числе и при ХГС, являются цитотоксические лимфоциты и система интерферонов [Sraap, M., 2012, Oliviero V., 2013]. Особенности функциональной активности NK- и NKT-клеток определяют течение самого заболевания и его исход [Ahlenstiel G., 2010]. Так, к примеру, повышение количества и функциональной активности цитотоксических клеток может приводить к массивному цитолизу инфицированных ВГС гепатоцитов с последующим замещением соединительной тканью и ранним развитием цирроза печени. С другой стороны, недостаточное число цитотоксических лимфоцитов и снижение их функционального потенциала может приводить к нарушению элиминации вирусов и внепеченочной репликации ВГС.

Интерфероны эндогенного происхождения обладают прямым противовирусным эффектом в отношении ВГС и играют важную роль при развитии противовирусного иммунного ответа [Oshiumi H., 2013].

При ХГС происходит нарушение синтеза интерферонов за счет блокирования вирусом основных путей синтеза интерферонов, а именно через гены TRIF и MAVS, благодаря активности вирусной протеазы NS3-4A [Meylan E., 2005, Li K., 2005, Wang B., 2013].

У некоторых пациентов имеются противопоказания для назначения препаратов интерферонов или их плохая переносимость, в таких случаях обсуждается возможность лечения таких пациентов без их использования [Gane, E,

2012]. В этих ситуациях изучение интерферонового статуса может иметь значение для назначения подобных схем терапии.

Поляризация иммунного ответа в сторону его усиления или, наоборот, в сторону иммунной супрессии определяется рядом факторов как самой иммунной системы, так и других систем (нервной, эндокринной). Баланс активационных и супрессивных сигналов определяет силу иммунного ответа. Основными супрессивными клетками иммунной системы на сегодняшний день принято считать Т-регуляторные клетки. Именно они прямыми и опосредованными механизмами (продукция TGF β) вызывают ограничение иммунного ответа [Sakaguchi S., 2010, Yamazaki S., 2011].

В нашем исследовании не было выявлено увеличения количества НК-клеток у пациентов с ХГС. Среднее значение их относительного содержания у всех пациентов составило 12,409% от общего количества лимфоцитов (нормальные значения 4,2-25,3%) (таблица 1). Абсолютное значение составило 240 кл/мкл (референсные значения 95 – 640 кл/мкл) (таблица 1). Достоверных различий в относительном и абсолютном содержании НК-клеток у пациентов с ХГС и доноров выявлено не было. Выявлена обратная корреляционная связь между относительным содержанием НК-клеток и вирусной нагрузкой ($r=-0,36$, $p=0,02$). Это может свидетельствовать о возможности прогрессирования заболевания при недостаточном количестве цитотоксических клеток.

Таблица 1. Содержание цитотоксических клеток у пациентов с ХГС и в группе сравнения (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Цитотоксические клетки	NK	NK	NKT	NKT	NKA	NKA
	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл
Группы						
Пациенты с ХГС N=81	12,409	240	5,911*	100	0,261**	0,601**
Группа сравнения N=20	11,887	223	6,042	121	1,07	20,7

Важной морфологической структурой НК-клеток являются гранулы, содержащие гранзим, перфорин, гранулизин, каспазы. В состав оболочки этих гранул входит LAMP-белок (Lysosomal-associated membrane protein). При активации НК-клеток содержимое гранул выбрасывается на поверхность для осуществления цитотоксического эффекта. В этот момент LAMP-белок экстернализируется на поверхности НК-клеток, что может характеризовать их функциональную активность [Liu D., 2009, Wang J., 2012].

При изучении функционального потенциала НК-клеток было выявлено достоверное снижение их активности, оцениваемой по экспрессии LAMP-белка. При определении активированных НК-клеток с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD107a⁺ их относительное содержание было значительно снижено и составило 0,261% (референсные значения 0,5 – 2%), что было достоверно меньше, чем у здоровых доноров - 1,07% ($p < 0,001$) (таблица 1). Абсолютное количество этих

клеток у пациентов с ХГС составило 0,601 кл/мкл (референсные значения 8 - 43 кл/мкл), а у здоровых доноров – 20,7 кл/мкл (таблица 1). Значительное снижение относительного и абсолютного содержания активированных НК-клеток у пациентов с ХГС по сравнению с группой доноров ($p < 0,001$) свидетельствует о нарушении их цитотоксической функции.

Относительное содержание НКТ-клеток составило 5,911% (референсные значения 1,3 - 10,2%) и было достоверно снижено по сравнению с группой доноров ($p < 0,05$) (таблица 1). Абсолютное значение составило в среднем 100 кл/мкл (референсные значения 33 - 221 кл/мкл), достоверно не отличаясь от аналогичного показателя в группе сравнения (таблица 1).

Полученные данные подтверждают необходимость изучения не только количества цитотоксических клеток, но и их функциональной активности. При исследовании относительного и абсолютного содержания НК-клеток существенных изменений в их содержании выявлено не было. Однако, при оценке количества активированных НК-клеток было выявлено их значительное снижение, что может лежать в основе прогрессирования ХГС [Pavio, N. , 2003].

При оценке относительного содержания Т-регуляторных клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ у пациентов, включенных в группу исследования, оно составило в среднем 5,65% (референсные значения 2,4-6,9%). Содержание этих клеток было достоверно выше, чем в группе доноров, у которых их содержание составило 4,49% ($p < 0,05$). Абсолютное количество Т-регуляторных клеток составило 0,046 тыс.кл/мкл (референсные значения 0,015-0,073 тыс.кл/мкл) и достоверно не отличалось от аналогичного показателя у здоровых доноров - 0,038 тыс.кл/мкл.

Различий в содержании Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов, инфицированных вирусами различных генотипов, выявить не удалось. У пациентов с высоким уровнем вирусной нагрузки относительное содержание Т-регуляторных клеток составило 5,13%, у пациентов с низким уровнем вирусной нагрузки – 6,52%. Однако, эти различия не были статистически значимыми. Достоверными были отличия относительного содержания этих клеток у пациентов с низким уровнем вирусной нагрузки (6,52%) и группой сравнения (4,49%) ($p < 0,05$).

Абсолютное содержание этих клеток у пациентов с высоким уровнем вирусной нагрузкой составило 0,043 тыс.кл/мкл, а у пациентов с низким уровнем нагрузки – 0,054 тыс.кл/мкл. Статистически достоверных различий между группами пациентов, инфицированных вирусами различных генотипов, и отличающихся по уровню вирусной нагрузки обнаружить не удалось.

Увеличение относительного содержания Т-регуляторных лимфоцитов может отражать развитие механизмов ограничения интенсивности иммунного ответа при ХГС, в том числе ограничения цитотоксической активности НК-клеток. В проведенном исследовании определялось повышение относительного содержания Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов с ХГС. Это, возможно, отражает развитие иммуносупрессии у пациентов с ХГС, что может приводить к неблагоприятному исходу заболевания, в том числе к циррозу печени и гепатоцеллюлярной карциноме.

Полученные данные соответствуют обсуждаемой в последнее время роли T-регуляторных лимфоцитов в канцерогенезе [Жулай, Г.А., 2013].

Для оценки интерферонового статуса нами был выбран биологический метод, как наиболее близкий к процессам происходящим *in vivo*. Именно он позволяет определять активность лейкоцитов в отношении синтеза интерферонов, отражая функциональный потенциал клеток-продуцентов. Среднее значение уровня сывороточного интерферона у всех пациентов группы составило 24,76 Ед/л и значительно отличалось от референсных значений для данного цитокина (0-10 Ед/л) и в сравнении с уровнем сывороточного интерферона у группы доноров (6,85 Ед/л, $p < 0,001$) (Таблица 2). Это может свидетельствовать о постоянной «естественной» стимуляции интерферогенных клеток в организме пациентов с ХГС.

Таблица 2. Уровни содержания и продукции интерферонов у пациентов с ХГС и в группе сравнения ($p < 0,001$).**

Значения содержания и продукции интерферонов	Общий сывороточный Ед/л	Продукция α/β -интерферонов Ед/л	Продукция γ -интерферона Ед/л
Пациенты с ХГС n= 73	24,76**	137,69**	66,31**
Группа сравнения n= 42	6,85	317,78	176,97

Уровень продукции лейкоцитами α/β -интерферонов составил 137,69 Ед/л и был значительно ниже референсных значений (250-520Ед/л) и уровня продукции в группе сравнения (317,78 Ед/л, $p < 0,001$) (Таблица 2). Уровень продукции лейкоцитами γ -интерферона составил 66,31 Ед/л и также был значительно ниже по сравнению с референсными значениями (110-250 Ед/л) и продукцией данного цитокина у здоровых доноров (176,97 Ед/л, $p < 0,001$) (Таблица 2). Это подтверждает литературные данные о нарушении синтеза эндогенных интерферонов при ХГС и позволяет использовать эти сведения при назначении интерферонотерапии [Vignau J., 2005].

Снижение способности к продукции интерферонов лейкоцитами может служить подтверждением патогенетической целесообразности назначения препаратов интерферонов в стандартных схемах лечения гепатита С.

У всех пациентов, независимо от молекулярно-биологических особенностей вируса, был повышен уровень сывороточного интерферона, а способность к продукции лейкоцитами эндогенных интерферонов была значительно снижена. Статистически достоверных различий в содержании сывороточного интерферона между группами пациентов, инфицированных вирусами 1 и 3 генотипов, а также пациентов с различными уровнями вирусной нагрузки выявить не удалось.

Оценка взаимосвязей иммунологических и биохимических показателей у пациентов ХГС. А. Маркеры цитолиза.

Существенный интерес с точки зрения изучения патогенеза ХГС представляет оценка взаимосвязей между иммунологическими параметрами и биохимическими маркерами, характеризующими основные синдромы заболевания – цитолитический и холестатический.

Различий в содержании НК-клеток между группами пациентов в зависимости от активности ферментов, характеризующих цитолиз, не было найдено. В то же время содержание НКТ-клеток у пациентов с нормальным уровнем активности АЛТ было достоверно ниже (5,91%), чем в группе сравнения (6,04%) ($p < 0,05$). Количество НКТ-клеток у пациентов с повышенным уровнем активности АСТ было достоверно выше (6,5%), чем у здоровых доноров (6,04%). Это может свидетельствовать о негативной реакции НКТ-клеток в отношении регенерации печеночной ткани [Sun R, 2004]. При повышенном уровне активности АЛТ, содержание НКТ-клеток не отличалось от группы сравнения.

Было выявлено достоверно более высокое относительное содержание Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов с двукратным (5,62%) и трехкратным увеличением активности АЛТ (5,68%, $p < 0,05$), а также у всех пациентов с увеличенным уровнем активности АЛТ в целом (5,76%, $p < 0,05$) по сравнению с донорами (4,49%).

Относительное содержание Т-регуляторных клеток было статистически выше также у пациентов с повышенным уровнем активности АСТ (5,68%) по сравнению с группой здоровых доноров (4,49%) ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о прогрессировании цитолитического синдрома у пациентов с ХГС при развитии иммуносупрессии, вызванной действием Т-регуляторных клеток, и увеличением цитолиза за счет повышения содержания цитотоксических клеток, что было подтверждено данным исследованием.

При сравнении уровня Т-регуляторных клеток с аналогичным показателем у доноров выявлено статистически значимое увеличение содержания этих клеток у пациентов с индексом фиброза от 1 до 2 ($p < 0,05$). Определена корреляционная взаимосвязь уровня Т-регуляторных клеток и степени фиброза у пациентов ХГС ($r = 0,33$, $p = 0,01$), что согласуется с литературными данными о взаимосвязи развития цирроза печени и повышения уровня Т-регуляторных клеток [Sugimoto K., 2003, Cabrera R., 2004].

Статистически значимых различий в содержании сывороточного интерферона между группами пациентов, отличавшихся по кратности увеличения активности АЛТ, установить не удалось. По характеру продукции α/β -интерферона лейкоцитами статистических различий среди пациентов с разными уровнями активности АЛТ также не было выявлено. Статистически достоверные различия касались более выраженного снижения способности к продукции лейкоцитами γ -интерферона у пациентов с двукратным увеличением активности АЛТ (63,34Ед/л) по сравнению с пациентами с нормальным уровнем АЛТ (74,6Ед/л) ($p < 0,05$).

Поскольку γ -интерферон является основным активирующим цитокином для цитотоксических клеток, снижение его синтеза может приводить к понижению их функциональной активности [Li Y., 2004]. Наше исследование подтверждает это предположение. У всех пациентов прослеживается снижение как относительного, так и абсолютного количества НК-клеток и, что особенно важно, отмечалось снижение активных форм НК-клеток ($CD16^+CD56^+CD107a^+$).

Статистических различий между группами пациентов с разным уровнем активности АСТ при оценке показателей сывороточного интерферона и характера продукции интерферонов выявлено не было.

Оценка взаимосвязей иммунологических и биохимических показателей у пациентов ХГС. Б. Маркеры холестаза.

Различий в содержании НК-клеток в зависимости от уровня билирубина выявлено не было. Однако, абсолютное содержание активированных НК-клеток у всех пациентов, независимо от степени выраженности лабораторных признаков холестатического синдрома, было статистически значимо ниже по сравнению с группой доноров ($p < 0,001$).

Относительное содержание активированных НК-клеток было снижено как у пациентов с повышенным (0,28%), так и нормальным уровнем билирубина (0,22%) в сравнении с донорами (1,07%) ($p < 0,001$).

У пациентов ХГС с повышенным уровнем билирубина было выявлено достоверное увеличение относительного содержания НКТ-клеток (7,62%) в сравнении с аналогичным показателем у здоровых доноров (6,04%) ($p < 0,05$).

У пациентов с нормальным уровнем билирубина относительное содержание НКТ-клеток было снижено (5,26%) по сравнению с аналогичным показателем в группе доноров (6,04%) ($p < 0,05$). Было выявлено статистически значимое снижение абсолютного содержания НКТ-клеток у пациентов с нормальным уровнем билирубина (80 кл/мкл) в сравнении с содержанием этих клеток у здоровых доноров (121 кл/мкл) ($p < 0,05$).

У пациентов ХГС с увеличенными уровнями ГГТП и ЩФ относительное количество активированных НК-клеток также было значительно снижено по сравнению с группой доноров (1,07%), составив 0,2% и 0,21% соответственно ($p < 0,001$).

Относительное содержание НК-клеток, экспрессирующих CD107a, находилось в обратной корреляционной связи с маркерами холестаза ГГТП и ЩФ ($r = -0,453$, $p = 0,015$ для ЩФ, $r = -0,286$, $p = 0,042$ для ГГТП). То есть чем ниже был уровень активированных НК-клеток, тем выше уровень маркеров холестаза.

Абсолютное содержание НКТ-клеток находилось в прямой корреляционной связи с уровнем общего билирубина ($r = 0,257$, $p = 0,034$).

Известно, что выраженность холестатического синдрома увеличивается по мере прогрессирования заболевания. Литературные данные также указывают на отсроченное действие этих клеток в иммунопатогенезе ХГС [Kenna T., 2003]. НКТ-клетки играют свою противовирусную роль на более поздних стадиях заболевания,

поэтому их уровень также связан с маркерами холестаза (билирубином), что и подтверждается литературными данными [Kondo Y., 2007].

У больных с повышенным уровнем билирубина и ГТПП было отмечено повышение относительного содержания Т-регуляторных клеток в сравнении с донорами. Так, у пациентов с повышенным уровнем билирубина среднее значение составило 5,82%, у пациентов с увеличением ГТПП - 6,04% (доноры - 4,49%, $p < 0,05$).

Оценка взаимосвязей иммунологических и биохимических показателей у пациентов ХГС. В. Маркеры фиброза.

Относительное содержание НК-клеток в группах пациентов с различной степенью выраженности фибротических изменений статистически не различалось.

Относительное содержание активированных форм НК-клеток не различалось в зависимости от степени выраженности фиброза, но во всех группах было достоверно ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,001$). Было выявлено статистически значимое снижение абсолютного содержания активированных форм НК-клеток у пациентов на всех стадиях фиброза по сравнению с донорами ($p < 0,001$). Эти данные также подтверждают наши представления о нарушении факторов врожденного иммунитета при хронических инфекциях, в том числе при ХГС.

Статистически значимое в сравнении с донорами (6,04%) снижение было выявлено в содержании относительного количества НКТ-клеток у пациентов с 3 степенью фиброза (2,68 %) ($p < 0,05$).

Наше исследование показало, что по мере прогрессирования фиброза увеличивается относительное содержание Т-регуляторных лимфоцитов ($p < 0,05$ у пациентов с 1 и 2 стадиями, 1 и 3 стадиями). Относительное содержание Т-регуляторных клеток у пациентов с фиброзом составило 5,82%. Относительное содержание Т-регуляторных лимфоцитов было увеличено как у пациентов со 2-й, так и с 3-й стадией фиброза (6,16% и 6,31% соответственно) в сравнении с аналогичным показателем у доноров (4,49%) ($p < 0,05$).

Абсолютное содержание Т-регуляторных клеток было увеличено у пациентов с 3-й (0,034 тыскл/мкл) и 4-й стадиями фиброза (0,061 тыскл/мкл) в сравнении с группой доноров (0,038 тыскл/мкл) ($p < 0,05$).

Полученные данные подтверждают наши сведения о нарастании содержания Т-регуляторных клеток и соответственно развитию иммуносупрессии по мере прогрессирования ХГС.

Достоверных различий в продукции интерферонов лейкоцитами у пациентов с различной степенью выраженности фибротических изменений выявлено не было.

Оценка взаимосвязей иммунологических параметров.

Уровень НКТ-клеток (как в относительном, так и в абсолютном значении) находился в обратной корреляционной связи с уровнем сывороточного интерферона (для относительного содержания НКТ - $r = -0,45$, $p = 0,002$, для абсолютного содержания НКТ - $r = -0,31$, $p = 0,04$). Содержание НКТ-клеток было в прямой

корреляционной связи с уровнем продукции α/β -интерферона лейкоцитами ($r=0,37$, $p=0,01$ для относительного количества НКТ-клеток и $r=0,25$, $p=0,01$ для абсолютного количества НКТ-клеток) (Таблица 3). Относительное содержание НКТ-клеток находилось в прямой корреляционной связи с уровнем продукции γ -интерферона лейкоцитами ($r=0,3$, $p=0,04$) (Таблица 3).

Таблица 3. Корреляционные взаимосвязи цитотоксических лимфоцитов и уровня сывороточного интерферона, способности продукции эндогенных интерферонов у пациентов с ХГС.

Показатель	Показатель	r	p
НКТ %	sIFN	-0,45	0,002
НКТ кл/мкл	sIFN	-0,31	0,04
НКТ%	продукция α/β -IFN	0,37	0,01
НКТ кл/мкл	продукция α/β -IFN	0,25	0,01
НКТ%	продукция γ -IFN	0,3	0,04

Известно, что основным активирующим цитокином для НК- и НКТ-клеток является γ -интерферон. Совместно с IL4 и IL15, γ -интерферон участвует в дифференцировке цитотоксических лимфоцитов [Paget С., 2007]. Полученные нами данные подтверждают взаимосвязь уровня НКТ-клеток и продукции интерферонов лейкоцитами.

В результате исследования была определена корреляционная связь между уровнем абсолютного содержания Т-регуляторных клеток и уровнем абсолютного содержания НК-клеток ($r=0,33$, $p=0,03$), а также абсолютным значением активированных форм НК-клеток ($r=0,33$, $p=0,02$) (Таблица 3). Относительное содержание Т-регуляторных клеток находилось в прямой корреляционной связи с относительным содержанием активных НК-клеток ($r=0,34$, $p=0,02$) (Таблица 3). Повидимому, это связано с компенсаторным увеличением Т-регуляторных лимфоцитов для предупреждения массивного цитолиза инфицированных гепатоцитов цитотоксическими клетками.

Полученные нами данные свидетельствуют о важном значении изучения основных факторов противовирусного иммунитета при ХГС. Изучение этих параметров иммунной системы является перспективным не только с позиции оценки прогноза заболевания, но и с точки зрения разных методов иммуномодулирующей терапии при ХГС. Изучение качественного и количественного состава НК-клеток дает возможность оценивать степень выраженности цитолитических процессов в ткани печени, поскольку именно НК-клетки осуществляют цитоллиз пораженных вирусом гепатоцитов [Warren, H.S., 2011]. Это подтвердилось и в нашем исследовании, в результате которого определена обратная корреляционная связь содержания НК-клеток и вирусной нагрузки, а также взаимосвязь числа этих клеток и уровня активности АСТ.

Следует отметить, что не всегда нормальные значения относительного и абсолютного содержания НК-клеток коррелируют с их адекватной функциональной активностью. В нашем исследовании было показано, что у подавляющего

большинства пациентов уровни абсолютного и относительного содержания цитотоксических клеток находились в пределах референсных значений. В то же время, при изучении функциональной активности НК-клеток выявлено значительное снижение клеток, экспрессирующих на своей поверхности LAMP-белок, что может свидетельствовать о снижении их цитотоксического потенциала. Это было показано и по данным описательной статистики, и при сравнении с группой здоровых доноров непараметрическими методами статистики.

Выявленное нами уменьшение функционального потенциала НК-клеток может приводить к вялотекущему инфекционному процессу.

Особое значение в иммунопатогенезе ХГС играют НКТ-клетки. Одни авторы считают, что основная их роль заключается в синтезе цитокинов и регуляции иммунного ответа в ткани печени [Mercer, J.C., 2005, Liu T. Y. 2008]. Это можно объяснить тем, что при ХГС эти клетки преимущественно продуцируют IL-13, действие которого связывают с развитием фибротических изменений в ткани печени [Кеппа Т., 2003]. Другие авторы делают акцент на их цитотоксическую функцию, но в более поздние сроки инфекции [Gao, B., 2009]. Наши данные также подтверждают указанное предположение.

В результате проведенного исследования удалось установить повышение содержания НКТ-клеток по мере прогрессирования холестатического синдрома. В то же время по мере увеличения стажа заболевания происходило истощение численного и функционального потенциала НК-клеток. Это может свидетельствовать о возможном «переключении» противовирусного ответа с НК-клеток на НКТ-клетки по мере прогрессирования заболевания.

С уровнем цитотоксической активности НК- и НКТ-клеток связана система интерферонов. Именно γ -интерферон оказывает активирующее действие на цитотоксические клетки.

В результате исследования было установлено, что у большинства пациентов, несмотря на повышенное содержание сывороточного интерферона, снижена способность к продукции α/β -интерферона и γ -интерферона лейкоцитами. Супрессия продукции α -интерферона может говорить о снижении противовирусной резистентности. Это может быть связано с истощением функции интерферогенных клеток и с супрессивным воздействием Т-регуляторных лимфоцитов. Снижение синтеза γ -интерферона, возможно, приводит к понижению функциональной активности НК- и НКТ-клеток.

Т-регуляторные лимфоциты осуществляют ограничение иммунного ответа. Они влияют на численный состав НК-клеток и на их функциональную активность. Это подтвердило и наше исследование, в результате которого были выявлены взаимосвязи количественного содержания НК-клеток и их функциональной активности с содержанием Т-регуляторных клеток.

Ограничение иммунного ответа может приводить к прогрессированию инфекции с последующим развитием цирроза печени или гепатоцеллюлярной карциномы. Следовательно, определение содержания Т-регуляторных клеток может иметь важное прогностическое значение для оценки характера исходов заболевания.

Таким образом, в иммунопатогенезе ХГС можно выделить наиболее актуальные направления для дальнейшего изучения и возможной медикаментозной коррекции. Во-первых, это исследование основных факторов противовирусного иммунитета, а именно количественных и функциональных характеристик НК- и НКТ-клеток и системы интерферонов. Во-вторых – оценка содержания Т-регуляторных клеток, как супрессоров противовирусного ответа. Именно баланс этих двух механизмов (активация-супрессия) определяет направление иммунного ответа, а значит, позволяет прогнозировать течение заболевания, его исход.

Выводы

1. Симптомы заболевания у пациентов с ХГС носят, в основном, неспецифический характер и проявляются наличием астенического синдрома (у 78,6 % пациентов), диспептических явлений (у 18%), тяжести и болей в правом подреберье (у 75,6%), дисфункции кишечника (у 27,3%). У большинства пациентов (85,7%) заболевание протекает с умеренно выраженным цитолитическим синдромом; повышенный уровень билирубина определяется лишь у 24,7% пациентов.
2. Среди обследованных пациентов преобладают больные, инфицированные вирусом 1в генотипа (50,6%) и вирусом генотипа 3а (39,3%). При этом у большинства пациентов (59,2%) наблюдается высокий уровень вирусемии, независимо от генотипа вируса.
3. У всех больных ХГС выявляется снижение способности лейкоцитов к продукции α/β -интерферона (137,69 Ед/л) и γ -интерферона (66,31 Ед/л) на фоне повышенного уровня сывороточного интерферона (24,76 Ед/л).
4. У пациентов с различными вариантами течения ХГС выявляется существенное снижение относительного и абсолютного содержания активированных НК-клеток с фенотипом $CD3^+CD16^+CD56^+CD107a^+$ (0,261% и 0,601 кл/мкл) по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров (1,07% и 20,7 кл/мкл соответственно) ($p < 0,001$).
5. Относительное содержание Т-регуляторных клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ у пациентов с ХГС достоверно выше, чем в группе сравнения (5,65% и 4,49% соответственно, $p < 0,05$). Содержание Т-регуляторных клеток находится в прямой корреляционной связи со степенью выраженности фиброза у пациентов ХГС ($r = 0,33$, $p = 0,01$).
6. При ХГС абсолютное содержание Т-регуляторных клеток находится в прямой корреляционной связи с абсолютным содержанием НК-клеток ($r = 0,33$, $p = 0,03$) и их активированных форм ($r = 0,33$, $p = 0,02$), что отражает развитие механизмов иммуносупрессии, ограничивающих цитолиз гепатоцитов.

Практические рекомендации

1. Для оценки тяжести и прогноза течения ХГС целесообразно определение не только относительного и абсолютного содержания НКТ- ($CD3^+CD16^+CD56^+$) и НК-клеток ($CD3^+CD16^+CD56^+$), но и их активированных форм ($CD3^+CD16^+CD56^+CD107a^+$), отражающих

- выраженность цитотоксического эффекта в ткани печени. При уменьшении количества активированных НК-клеток цитолиз инфицированных клеток снижается, при повышении содержания активированных НК-клеток возникают более тяжелые цитотоксические повреждения в ткани печени.
2. Для прогнозирования раннего развития фиброза печени пациентам с ХГС показано исследование содержания Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127^{low}. Повышение уровня Т-регуляторных клеток может свидетельствовать о неблагоприятном течении заболевания из-за оказываемой ими иммуносупрессии. Снижение уровня Т-регуляторных лимфоцитов может свидетельствовать о развитии неконтролируемых иммунных реакций.
 3. Для прогноза течения ХГС рекомендовано изучение комплекса иммунологических параметров и их взаимосвязей (субпопуляционный состав лимфоцитов, включающий содержание НК-клеток и их активированных форм, содержание НКТ-клеток и Т-регуляторных лимфоцитов) в сопоставлении с клинико-биохимическими показателями у пациентов. Включение в комплекс лабораторных исследований показателей, определяющих эффекторные и регуляторные функции иммунной системы, позволяет оценить характер патологических процессов, в частности, развития фиброзных изменений в печени и прогноз течения ХГС с учетом интенсивности иммунного ответа у различных пациентов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Селькова М.С., Никитина О.Е. Клинико-биохимическая характеристика больных хроническим гепатитом С // Вирусные гепатиты - эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика: материалы конференции. — М., 2007. — С. 220-221.
2. Эсауленко Е.В., Шелестова А.П., Никитина О.Е., Грудинин М.П., Селькова М.С., Писарева М.А. Вирусологический мониторинг при комбинированной противовирусной терапии хронического гепатита С с использованием отечественных препаратов // Terra Medica. — 2009. — №4-5. — С. 10-12.
3. Селькова М.С., Эсауленко Е.В., Селютин А.В., Михайлова В.А. Оценка содержания популяций цитотоксических лимфоцитов и Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов с хроническим гепатитом С // Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями: материалы международной конференции. — СПб., 2010. — С.15.
4. Селькова М.С., Эсауленко Е.В., Аникин В.Б., Михайлова В.А. Маркеры клеточного иммунитета и уровень цитолитического синдрома при хронической HCV-инфекции // Актуальные вопросы инфекционной патологии: материалы научной конференции молодых ученых с международным участием. — М., 2011. — С. 65.
5. Селькова М.С., Эсауленко Е.В., Михайлова В.А., Селютин А.В. Т-reg лимфоциты и НК-клетки у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С // Материалы XIV Всероссийского научного форума с международным

- участием им. акад. В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». — СПб., 2011. — С.408.
6. Селькова М.С., Никитина О.Е., Селютин А.В., Михайлова В.А., Эсауленко Е.В. Особенности содержания НК-клеток у больных хроническим гепатитом С // Медицинская иммунология. — 2012. — Т.14, № 4-5. — С.439-444.
 7. Селькова М.С., Селютин А.В., Сельков С.А. Особенности содержания Т-регуляторных лимфоцитов и НК-клеток у пациентов с хроническим гепатитом С // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2, №4. — С.715-722.
 8. Селькова М.С., Селютин А.В., Сельков С.А. Содержание регуляторных Т-лимфоцитов при хроническом гепатите С // Материалы V Междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Урогенитальные инфекции и репродуктивное здоровье: клиничко-лабораторная диагностика и терапия». — СПб., 2012. — С.89.
 9. Селькова М.С. Цитофлуориметрический анализ содержания цитотоксических клеток у пациентов с хроническим гепатитом С // Журнал инфектологии. — 2013. — Т.5, №1. — С. 69-74.
 10. Селькова М.С., Селютин А.В., Тишков А.В. Содержание Т-reg у пациентов с ХВГС // Российский иммунологический журнал. — 2013. — Т.7(16), №2-3. — С.254 (материалы Объединенного иммунологического форума, Нижний Новгород, 2013)

Список использованных сокращений

ХГС- хронический гепатит С

ВГС – вирус гепатита С

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АСТ - аспаратаминотрансфераза

ГТПП – γ -глутамилтранспептидаза

ЩФ – щелочная фосфатаза

NK-клетки – клетки с фенотипом $CD3^- CD16^+ CD56^+$ (NK)

NKT-клетки - клетки с фенотипом $CD3^+ CD16^+ CD56^+$ (NKT)

Активированные NK-клетки – клетки с фенотипом $CD3^- CD16^+ CD56^+ CD107a^+$ (NKA)

T-регуляторные клетки (T-регуляторные лимфоциты) – клетки с фенотипом $CD4^+ CD25^+ CD127^{low}$ (T-reg)

sIFN (interferon) – сывороточный интерферон

α/β -IFN – альфа/бета интерферон

γ -IFN – гамма интерферон

IL-4 (Interleukin-4) – интерлейкин - 4

IL-13 (Interleukin-13) – интерлейкин – 13

IL-15 (Interleukin-15) – интерлейкин - 15

LAMP (Lysosomal-associated membrane protein) - гликозилированный протеин

TRIF (transcription factors IRF3) - транскрипционный фактор синтеза интерферонов

MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) - транскрипционный фактор синтеза интерферонов

TGF β (Transforming growth factor beta) – трансформирующий ростовой фактор β .

Подписано в печать «10» сентября 2013 г. Формат 60х84/16

Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,3. Тираж 100 экз. Заказ № 111

Типография «Восстания – 1»

191036, Санкт-Петербург, Восстания, 1.