

На правах рукописи

БАСИНА

Валентина Владимировна

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО
ГЕПАТИТА С**

14.01.09 – инфекционные болезни

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители:

Эсауленко Елена Владимировна – доктор медицинских наук, профессор

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, академик РАН, профессор

Официальные оппоненты:

Кравченко Ирина Эдуардовна – доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Назаров Петр Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией общей иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 года в ____ часов на заседании диссертационного Совета Д.208.090.02 при Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. академика И.П. Павлова (197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, 12, корп. 44, зал заседаний Ученого Совета, ауд. 12, 6 этаж).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8 и на сайте <http://www.1spbgmu.ru/ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д.208.090.02

доктор медицинских наук, профессор

Александров Альберт Леонидович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Гепатит С (ГС) распространен во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) наиболее часто заболевание встречается на территориях Восточного Средиземноморья и Европейском регионе, в которых распространенность в 2015г. составила 2,3% и 1,5% [World Health Organization (WHO), 2015]. Активность эпидемического процесса ГС снижается медленно, она поддерживается за счет хронических форм заболевания. В 2018 году заболеваемость хроническим гепатитом С (ХГС) на территории России в среднем составила 32,72 на 100 тыс. населения, снизившись на 20% по сравнению с предыдущим годом. Однако по данным Роспотребнадзора с начала регистрации (1999г.) по 2018 г. его доля в общей структуре хронических вирусных гепатитов увеличилась с 54,8 % до 77,6 % [Покровский В.И., Тотолян А.А., 2016; Государственный доклад, 2019; Пименов Н. Н. и др., 2018].

Вопрос о снижении заболеваемости ХГС в настоящее время является актуальным как для глобального, так и российского здравоохранения [WHO, 2018]. ГС, в отличие от гепатита В, является не управляемой методами специфической профилактики инфекцией. Следовательно, достигнуть значимого снижения заболеваемости возможно только посредством проведения этиотропной терапии (противовирусной, ПВТ), которая в данном случае является профилактической мерой, ведущей к сокращению источников вируса гепатита С (ВГС).

На сегодняшний день ПВТ ХГС пегилированными интерферонами и рибавирином в сочетании с ингибиторами протеаз остается утвержденным стандартом терапии в соответствии с российскими клиническими рекомендациями [Ющук Н.Д. и др., 2015]. Эффективность терапии составляет не более 80%, но ее можно повысить за счет купирования возникающих нежелательных явлений и индивидуального подхода к назначению ПВТ [Маевская М.В. и др., 2017; Houghton, M. et al., 2005; Lawitz, E. et al., 2014]. Возможность применения новых комбинаций препаратов увеличила эффективность и сократила длительность ее проведения. Несмотря на это, применение ПВТ у некоторых пациентов недостаточно изучено и может вызывать мутации вируса, приводящие к лекарственной устойчивости.

Наиболее часто у практических врачей возникает вопрос оптимального выбора схем ПВТ, поскольку приходится учитывать как экономические аспекты, так и эффективность и безопасность терапии. Использование менее дорогостоящих

препаратов интерферона позволяет увеличить охват терапией пациентов. В связи с этим попытки прогнозировать эффективность интерфероновой терапии ХГС на этапе ее планирования не теряют актуальности.

Степень разработанности темы исследования

Зарубежные и отечественные авторы сообщают о результатах исследований, направленных на обнаружение предикторов эффективности ПВТ, проводимой в различных режимах. На этапе планирования терапии ХГС (ВГС 1 генотипа) в качестве предикторов успешной ПВТ принято использовать факторы пациента (пол, возраст, сопутствующие заболевания, наличие вредных привычек), вируса (генотип, вирусная нагрузка, наличие мутаций) и заболевания (стадия фиброза печени). В настоящее время активно идет поиск клинико-генетических предикторов. Если полиморфизм гена IL28B используется в клинической практике, то другие только изучаются. Результаты исследований по влиянию клинико-генетических предикторов на эффективность ПВТ с использованием препаратов интерферона в настоящее время неоднозначны [Taghavi S. A. et. Al., 2008; Dubynska H. M. et. al., 2016; Сизова Л.М., 2017]. Учитывая, что многие из генов способны запускать механизмы врожденного иммунитета при взаимодействии с ВГС, другим направлением поиска предикторов эффективности терапии может быть клинико-иммунологическое. В качестве потенциальных биомаркеров фиброза печени, а также предикторов эффективности ПВТ, могут рассматриваться некоторые цитокины/хемокины и определенные субпопуляции иммунокомпетентных клеток.

Цель исследования

Оптимизировать противовирусную терапию хронического гепатита С путем поиска иммунологических биомаркеров, прогнозирующих эффективность различных схем терапии на этапе планирования.

Задачи исследования

1. Выявить клинико-иммунологические особенности ХГС на разных стадиях заболевания с учетом содержания в крови некоторых цитокинов/хемокинов и различных субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы (CXCR3 и CCR6).
2. Изучить содержание некоторых цитокинов/хемокинов и субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы (CXCR3 и CCR6), в периферической крови

пациентов с ХГС с учетом стадии фиброза печени в динамике проведения ПВТ с использованием интерферонсодержащих схем (PEG-IFN).

3. Определить клинико-иммунологические предикторы эффективности ПВТ ХГС с использованием препаратов PEG-IFN.

4. Оценить динамику изучаемых цитокинов/хемокинов и уровня различных субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы (CXCR3 и CCR6), в периферической крови пациентов с ХГС с учетом стадии фиброза в ходе проведения ПВТ с использованием препаратов прямого противовирусного действия (ППД).

5. На основании клинико-иммунологических показателей разработать алгоритм выбора оптимальной схемы этиотропной терапии ХГС при инфицировании ВГС 1-го генотипа.

Научная новизна

Впервые дана комплексная оценка клинической и прогностической значимости актуальных хемокинов и хемокиновых рецепторов лимфоцитов у пациентов с ХГС в зависимости от стадии фиброза печени и различных режимов ПВТ.

Исходные уровни хемокина CCL20/MIP-3 α и цитокина TNF- α в плазме крови пациентов с ХГС впервые предложены в качестве прогностических биомаркеров, позволяющих уточнить выбор терапии перед ее проведением.

С использованием указанных ранее цитокинов/хемокинов разработан высокоинформативный алгоритм подбора режима этиотропной терапии для пациентов с ХГС, инфицированных ВГС 1-го генотипа.

Теоретическая и практическая значимость работы

Была установлена роль хемокинового рецептора CXCR3 и его лигандов CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC, а также хемокинов CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3 α и цитокина TNF- α в иммунопатогенезе ХГС и иммунологическом ответе на ПВТ.

Установлена связь между этапом ПВТ ХГС и концентрацией некоторых цитокинов/хемокинов в плазме крови пациентов, заключающаяся в том, что по мере увеличения длительности приема препаратов снижается концентрация CXCL11/ITAC и повышается – TNF α у пациентов с отсутствием фиброза печени, получавших терапию с использованием препаратов PEG-IFN. Выявлено увеличение концентрации хемокина CCL2/MCP-1 у пациентов с различной стадией фиброза печени в начальной точке

терапии. У пациентов, достигших устойчивого вирусологического ответа, получавших ПВТ в безинтерфероновом режиме, наблюдалось достоверное снижение концентрации хемокина CXCL10/IP-10 независимо от наличия или отсутствия фиброза печени.

Дана характеристика различных субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновый рецептор CCR6 и CXCR3, у пациентов с ХГС, имеющих различную выраженность фибротических изменений в ткани печени и получавших различные режимы этиотропной терапии.

Основная практическая значимость работы заключается в том, что предложены биомаркеры из системы цитокинов/хемокинов CCL20/MIP-3 α и TNF- α для прогноза эффективности ПВТ ХГС (ВГС 1-го генотипа) с использованием интерферонов. Разработан алгоритм подбора режима этиотропной терапии ХГС при инфицировании вирусом 1-го генотипа с использованием данных о концентрациях цитокина TNF- α и хемокина CCL20/MIP-3 α . Эффективность данных биомаркеров доказана в результате анализа информативности содержания цитокинов/хемокинов в плазме крови.

Методология и методы исследования

В диссертационной работе применена общенаучная методология с использованием системного подхода, основанного на методах доказательной медицины. Для достижения поставленной цели и решения соответствующих задач применены адекватные клинические, лабораторные, иммунологические, молекулярно-биологические, инструментальные, статистические методы (проведен ROC-анализ) оценки состояния здоровья пациента.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Клиническое течение ХГС характеризовалось маловыраженной симптоматикой с незначительными проявлениями синдрома цитолиза при различных уровнях вирусной нагрузки и стадиях заболевания. Оценка содержания некоторых цитокинов/хемокинов в плазме крови выявила повышение уровней хемокинов CCL20/MIP-3 α , CXCL11/ITAC и цитокина TNF α вне зависимости от стадии заболевания и корреляционную взаимосвязь степени выраженности фибротических изменений в ткани печени с концентрацией хемокина CXCL9/MIG и активностью цитолиза.

2. Процесс эрадикации ВГС в результате этиотропной терапии сочетается со следующими иммунологическими изменениями в плазме крови пациентов: в группе

пациентов, получавших ПВТ в интерфероновом режиме, наблюдалось снижение исходно повышенной концентрации CXCL11/ITAC и повышение TNF α при отсутствии фиброза печени, а у пациентов с различными стадиями фиброза печени наблюдалось повышение CCL2/MCP-1. У пациентов, получавших ПВТ в безинтерфероновом режиме, наблюдалось снижение исходно повышенных концентраций CXCL10/IP-10 независимо от стадии фиброза печени.

3. Эффективность ПВТ при интерфероновом режиме сопровождалась активацией различных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов в случае достижения вирусологического ответа: у пациентов без фиброза печени характерно увеличение содержания CTL-лимфоцитов и NK-клеток и снижение уровня В-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности хемокиновый рецептор CXCR3+, а для пациентов с различными стадиями фиброза печени характерно увеличение относительного содержания CXCR3+NK- и CCR6+NKT-клеток. ПВТ в безинтерфероновом режиме сопровождалась повышением содержания CCR6+ NKT-клеток при выраженном фиброзе печени и тенденцией к повышению содержания Т-лимфоцитов в отсутствии фиброза печени.

4. Разработан алгоритм, основанный на определении исходного уровня TNF α и CCL20/MIP-3 α в плазме крови, позволяющий выбрать оптимальную схему противовирусной терапии ХГС (ВГС 1-го генотипа).

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом выполненных наблюдений, использованием современных методов исследования: клинико-лабораторных, инструментальных, серологических, иммунологических, молекулярно-биологических, молекулярно-генетических и статистических.

Материалы диссертации доложены на XV Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015 г.); на XVI Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017 г.); на Всероссийском терапевтическом конгрессе с международным участием «Боткинские чтения» (Санкт-Петербург, 2019 г.); на 19-ой Российско-Итальянской конференции «Актуальные вопросы социально-значимых инфекционных заболеваний» (Вологда, 2019 г.)

Получен патент на изобретение RUS 2583939 «Способ лабораторной диагностики стадии фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С».

Подана заявка на получение патента на изобретение «Способ прогнозирования результата ПВТ ХГС (ВГС 1-го генотипа) в интерферон-содержащем режиме и выбора альтернативной схемы терапии с помощью лабораторной диагностики плазмы крови пациентов» 12.12.2019г. Входящий №081285. Регистрационный №2019141708.

Основные положения и результаты исследования внедрены в практическую работу СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина», в педагогический процесс кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России.

По теме диссертационного исследования опубликовано 15 печатных работ, в том числе 10 - в журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автор совместно с научными руководителями провела определение темы исследования, целей и задач. Автором самостоятельно проведен подбор и анализ отечественных и зарубежных литературных источников по изучаемой проблеме. Автор самостоятельно проводила клиническое обследование и наблюдение пациентов, принимала участие в иммунологическом обследовании пациентов, провела ретроспективный анализ историй болезней, амбулаторных карт пациентов и формировала группы исследования. Автор полностью сформировала базу данных, выполнила статистическую и графическую обработку материала, обобщила полученные результаты.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 149 страницах компьютерного набора, состоит из введения, обзора литературы, характеристики пациентов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшего исследования темы, списка сокращений и списка литературных источников. Работа дополнена 19 таблицами и 35 рисунками. Список литературы включает 169 источников, из которых 34 отечественных и 135 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проведено в период с 2015 по 2017 гг. на кафедре инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина» и ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Обследовано 123 пациента (63 мужчины и 60 женщин) с диагнозом ХГС в возрасте от 23 до 71 года (средний возраст $48,6 \pm 7,6$ лет). Все пациенты прошли обследование, которое включало сбор жалоб, анамнеза заболевания и жизни пациента, данных эпидемиологического анамнеза. Проводился физикальный осмотр, анализ клинических и биохимических показателей крови, серологических маркеров вирусных гепатитов, молекулярно-биологическое исследование ВГС с определением уровня вирусной нагрузки и генотипа вируса, инструментальное обследование пациента (УЗИ органов брюшной полости, эластография печени, фиброгастроуденоскопия).

У 86 пациентов и 26 условно здоровых лиц определено содержание цитокинов ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$) и хемокинов ($CCL20/MIP-3\alpha$, $CXCL9/MIG$, $CXCL11/ITAC$) в плазме крови методом мультиплексного анализа. Методом проточной цитометрии выявляли содержание субпопуляций лимфоцитов: Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток, НКТ-клеток и экспрессию этими клетками хемокиновых рецепторов $CCR6$ и $CXCR3$.

Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ R. При анализе данных для сравнения групп, а также исследования временной зависимости использовались U-тест Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса и Фридмана. Корреляционный анализ с включением клинико-лабораторных и иммунологических показателей проведен методом двустороннего рангового корреляционного анализа Спирмена.

Для прогноза эффективности ПВТ на основе анализа концентраций выбранных цитокинов/хемокинов использовался ROC-анализ. Адекватность выбранного метода оценивалась по площади под ROC-кривой. Пороговое значение концентрации выбранных параметров для предсказания результата ПВТ определялось по значению, соответствующему максимуму суммы чувствительности и специфичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе исследования установлено, что у 44% пациентов жалобы отсутствовали, подтверждая возможность бессимптомного клинического течения ХГС. Выявлена связь между возрастом пациентов, сроком их инфицирования и размерами печени. У всех пациентов отсутствовали выраженные проявления экскреторно-билиарного и холестатического синдромов, но в 16,3% случаев выявлены субклинические признаки поражения печени (субиктеричность склер).

При исследовании биохимических показателей крови выявлено, что у всех пациентов присутствовали признаки минимальной биохимической активности маркеров цитолитического и экскреторно-билиарного синдромов. Лабораторные проявления экскреторно-билиарного синдрома наблюдались в 13% случаев. У 18,7% пациентов был снижен ПТИ, который расценивался как проявление геморрагического синдрома. У 7,7% обнаружено снижение уровня общего белка и альбумина крови, что является результатом нарушения белково-синтетической функции печени. В гемограмме у 7,3% пациентов обнаружена анемия, у 20,3% - тромбоцитопения, у 9,8% - лейкоцитоз и у 5,7% - лейкопения.

В ходе проведения молекулярно-биологического исследования ВГС установлена его принадлежность к 1b и 3a генотипам, что согласуется с данными, полученными при изучении циркуляции ВГС в когорте пациентов Российской Федерации. Уровень ВН был высокий в 47% случаев, средний – в 22% и низкий – в 31%.

При изучении фиброза печени выявлено отсутствие фиброза (F0) у 45 пациентов (36,6%), а в остальных случаях стадии фиброза F1-F4 (n=78, 63,4%).

Обнаружены корреляционные связи между стадией фиброза и продолжительностью заболевания ($r=0,263$; $p<0,05$), степенью увеличения печени ($r=0,587$; $p<0,0001$), активностью АлАТ, АсАТ ($r=0,237$; $p<0,05$ и $r=0,325$; $p<0,05$, соответственно) и количеством тромбоцитов ($r=-0,371$; $p<0,0001$).

Большая продолжительность заболевания сопряжена с большим риском формирования фиброза печени, что сочетается с увеличением печени и изменением ее эластичности и плотности. Взаимосвязь активности трансаминаз и фиброза печени указывает на активацию Т-клеточного звена иммунитета в ответ на действие ВГС, в результате чего происходит апоптоз гепатоцитов и высвобождение в кровеносное русло ферментов цитолиза.

В ходе иммунологического исследования обнаружено, что концентрация цитокинов/хемокинов: TNF α , CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL11/ITAC у пациентов с ХГС в разы (1,9; 1,6; 3,2 и 2,8 раза) превышает концентрации тех же показателей в группе условно здоровых лиц ($p=0,0001$, $p=0,0002$, $p<0,0001$, $p<0,0001$ соответственно). Выявлены корреляционные связи между TNF α и CXCL9/MIG ($r=0,397$; $p<0,001$), TNF α и CXCL11/ITAC ($r=0,500$; $p<0,0001$), CXCL9/MIG и CXCL11/ITAC ($r=0,515$; $p<0,0001$), а также CCL20/MIP-3 α и CXCL11/ITAC ($r=0,431$; $p<0,005$). Слабая прямая корреляционная зависимость обнаружена между IFN γ и TNF α ($r=0,278$; $p<0,005$), IFN γ и CCL20/MIP-3 α ($r=0,272$; $p<0,005$) и между CCL20/MIP-3 α и CXCL9/MIG ($r=0,218$; $p<0,005$).

Таким образом, установлено, что лиганды CXCR3 - CXCL9/MIG и CXCL11/ITAC находятся в прямой корреляционной зависимости.

Также исследована корреляционная зависимость между концентрацией цитокинов/хемокинов и стадией заболевания. Установлено наличие статистически прямых взаимосвязей между хемокином CXCL9/MIG и степенью выраженности фиброза печени ($r=0,3$; $p=0,02$). Выявлена тенденция к увеличению концентрации CCL20/MIP-3 α ($r=0,206$; $p=0,06$) и TNF α ($r=0,207$; $p=0,05$) при прогрессировании фиброза печени.

При исследовании взаимосвязей между концентрацией цитокинов/хемокинов и клинико-биохимическими показателями обнаружена слабая связь между возрастом пациентов и содержанием хемокина CXCL9/MIG ($r=0,3$; $p<0,05$), между степенью увеличения печени и хемокином CCL20/MIP-3 α ($r=0,221$; $p<0,05$). По всей видимости, с возрастом увеличивались срок инфицирования, степень прогрессии фиброза печени и активировался процесс специфического Т-клеточного иммунного ответа. Увеличение концентраций IFN γ и TNF α коррелировало со снижением содержания тромбоцитов ($r=-0,3$; $p<0,05$ и $r=-0,313$; $p<0,05$). Цитокины IFN γ и TNF α являются маркерами хронического воспаления, в том числе и при хронических вирусных гепатитах, с длительностью инфекционного процесса связана аутоиммунная агрессия по отношению к тромбоцитам.

Прямая корреляционная зависимость TNF α и содержания нейтрофилов в крови указывает на активацию маркеров воспаления в ответ на обострение сопутствующей хронической бактериальной патологии.

В ходе анализа содержания субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6, в периферической крови пациентов проведено сравнение с группой

условно здоровых лиц. У пациентов с ХГС медиана содержания Т-хелперов не отличается, а цитотоксических Т-лимфоцитов – в три раза выше, чем у условно здоровых лиц. Увеличение содержания CTL указывает на активацию Т-киллерного звена иммунитета в ответ на репликацию ВГС. Также содержание НК-клеток у больных с ХГС в 1,6 раза больше, чем у условно здоровых лиц.

Распределение лимфоцитов у пациентов с ХГС с увеличением процентного содержания клеток, обладающих цитотоксической активностью (CTL и НК-клеток), объясняется активацией эффекторного звена иммунитета в ответ на инфицирование ВГС.

У пациентов с ХГС определялись низкие показатели Th, CTL, НК-клеток, НКТ-клеток, экспрессирующих CXCR3. Содержание Т-хелперов с CXCR3 было в 1,3 раза меньше ($p=0,003$), чем у условно здоровых лиц. По сравнению с условно здоровыми лицами процентное содержание CTL с CXCR3 оказалось в 1,6 раза меньше ($p<0,0001$), содержание НК-клеток с CXCR3 было в 3,4 раза меньше ($p<0,0001$), а НКТ-клеток с CXCR3 – в 2,7 раза меньше ($p<0,0001$).

У пациентов с ХГС В-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3, было в четыре раза больше ($p<0,0001$), чем у условно здоровых лиц.

Относительное содержание Th-лимфоцитов, CTL, НКТ-клеток экспрессирующих CCR6, было меньше данных показателей у условно здоровых лиц: Th - в 2 раза ($p<0,0001$), CTL - в 1,5 раза ($p=0,052$) и НКТ-клеток - в 3 раза ($p<0,0001$).

Снижение процентного содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6, при ХГС является результатом вирусиндуцированного угнетения Т-клеточного звена иммунитета с цитотоксической активностью. Увеличение уровня В-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3, объясняется активацией гуморального звена иммунитета в ответ на HCV-инфекцию.

Для выделения предиктора эффективности ПВТ наблюдалась группа пациентов ($n=41$) с ХГС, инфицированных вирусом ВГС 1-го генотипа. У них определяли клинико-иммунологические и биохимические показатели на старте и в динамике ПВТ. У всех пациентов уровень ВН был высоким. Пациенты получали терапию с PEG-IFN в сочетании с рибавирином и ингибитором NS3-4A сериновой протеазы.

В зависимости от эффективности лечения пациенты были разделены на ответивших (87,8%) и не ответивших (12,2%) на проведенную терапию. У ответивших на терапию пациентов развился быстрый вирусологический ответ ($n=31$) и ранний вирусологический ответ ($n=36$).

У пациентов в ходе лечения нормализовалась активность ферментов цитолиза (АлАТ, АсАТ) в те же сроки, что и произошло снижение РНК ВГС до неопределяемого уровня.

Исследования перед началом ПВТ выявили достоверные корреляционные зависимости между уровнями хемокинов и цитокинов воспаления.

Далее пациентов, ответивших на терапию, разделили на две группы: I группа – с отсутствием фиброза печени и II группа – с наличием фиброза. В ходе ПВТ исследована концентрация цитокинов/хемокинов: TNF α , IFN2 α , IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC - периферической крови.

У пациентов без фиброза печени, ответивших на ПВТ, в ходе лечения снижался уровень хемокина CXCL11/I-TAC, являющегося лигандом CXCR3 рецептора, что свидетельствовало об эрадикации ВГС и прекращении высвобождения хемокинов пораженными клетками. Выявлено динамичное повышение концентрации TNF α с максимальными показателями к окончанию терапии.

У пациентов с разной стадией фиброза, ответивших на ПВТ, обнаружено достоверное увеличение уровня хемокина CCL2/MCP-1 с максимальным нарастанием к середине лечения с последующим снижением. Вероятно, это связано с тем, что после эрадикации ВГС к 4-12 неделе терапии (сроки негативации РНК HCV в периферической крови) постепенно прекращается высвобождение данного хемокина из клеток.

Исследование субпопуляций лимфоцитов в ходе терапии показало, что у пациентов I группы происходило увеличение содержания клеток с цитотоксической активностью: CTL и NK-клетки, экспрессирующих CXCR3. В то же время количество В-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3, снижался. Воздействие экзогенного интерферона приводило к активации Т-клеточного цитотоксического звена иммунитета, ответственного за элиминацию ВГС из организма путем запуска апоптоза гепатоцитов, пораженных ВГС.

У пациентов II группы также обнаружено увеличение содержания цитолитических клеток за счет NK- и NKT-клеток, что свидетельствовало об активации клеточного иммунитета.

Одна из задач исследования заключалась в поиске биомаркера из группы цитокинов/хемокинов, позволяющего прогнозировать результат терапии на этапе ее планирования. На примере ПВТ с использованием PEG-IFN такой маркер был

идентифицирован. Им оказался хемокин CCL20/MIP-3 α , уровень которого на старте ПВТ был в 4 раза выше у не ответивших на лечение пациентов, чем у ответивших и условно здоровых лиц. Кроме того, была обнаружена тенденция к повышению концентрации TNF α на старте ПВТ в группе не ответивших на лечение.

В ходе проведенного ROC-анализа были построены ROC-кривые и определены ППК, что дало возможность построения «дерева решений», позволяющего разделить пациентов на группы ответивших и не ответивших на ПВТ на ее старте. Анализ показал, что среди цитокинов/хемокинов наиболее информативными были CCL20/MIP-3 α и TNF α . Площадь под кривой была равна 0,86 для CCL20/MIP-3 α и 0,73 для TNF α . Построение «дерева решения» с использованием только CCL20/MIP-3 α показало, что оптимальным критерием НВО является концентрация этого хемокина на уровне ниже 25 пг/мл. Чувствительность метода составила 91%, а специфичность – 80% для CCL20/MIP-3 α и 56-100% для TNF α . Если в дополнение к CCL20/MIP-3 α для построения «дерева решений» использовать и TNF α , то это позволяет уточнить вероятность принадлежности пациента к группе ответчиков. Был разработан алгоритм подбора эффективной ПВТ, представленный на рис. 1.

Внедрение программ иммунологического скрининга у пациентов с ХГС, инфицированных ВГС 1-ого генотипа, перед проведением ПВТ позволит более эффективно подобрать схему терапии.

Заключительным этапом исследования явилось изучение клинико-лабораторных и иммунологических показателей у пациентов с ХГС в динамике проведения ПВТ в безинтерфероновом режиме (n=14). Средний возраст составил 48,2 \pm 13,6 лет. Все пациенты, получавшие ПППД, ответили на терапию, что не позволило выделить предикторы эффективности.

В ходе ПВТ исследованы изменения концентрации некоторых цитокинов/хемокинов. Анализ данных эластографии показал, что у 78,6% пациентов (n=11) был выраженный фиброз (F3) и цирроз печени (F4). У троих пациентов (21,4%) фиброз отсутствовал (F0).

В ходе лечения у пациентов двух групп негативация PCR HCV в периферической крови происходила уже ко 2-й неделе, также к данному сроку нормализовалась активность АлАТ/АсАТ и ГГТП. Корреляционная зависимость между уровнем ВН и активностью АлАТ, обнаруженная во время исследования, характеризует цитолитический синдром и цитопатическое действие ВГС на гепатоциты.

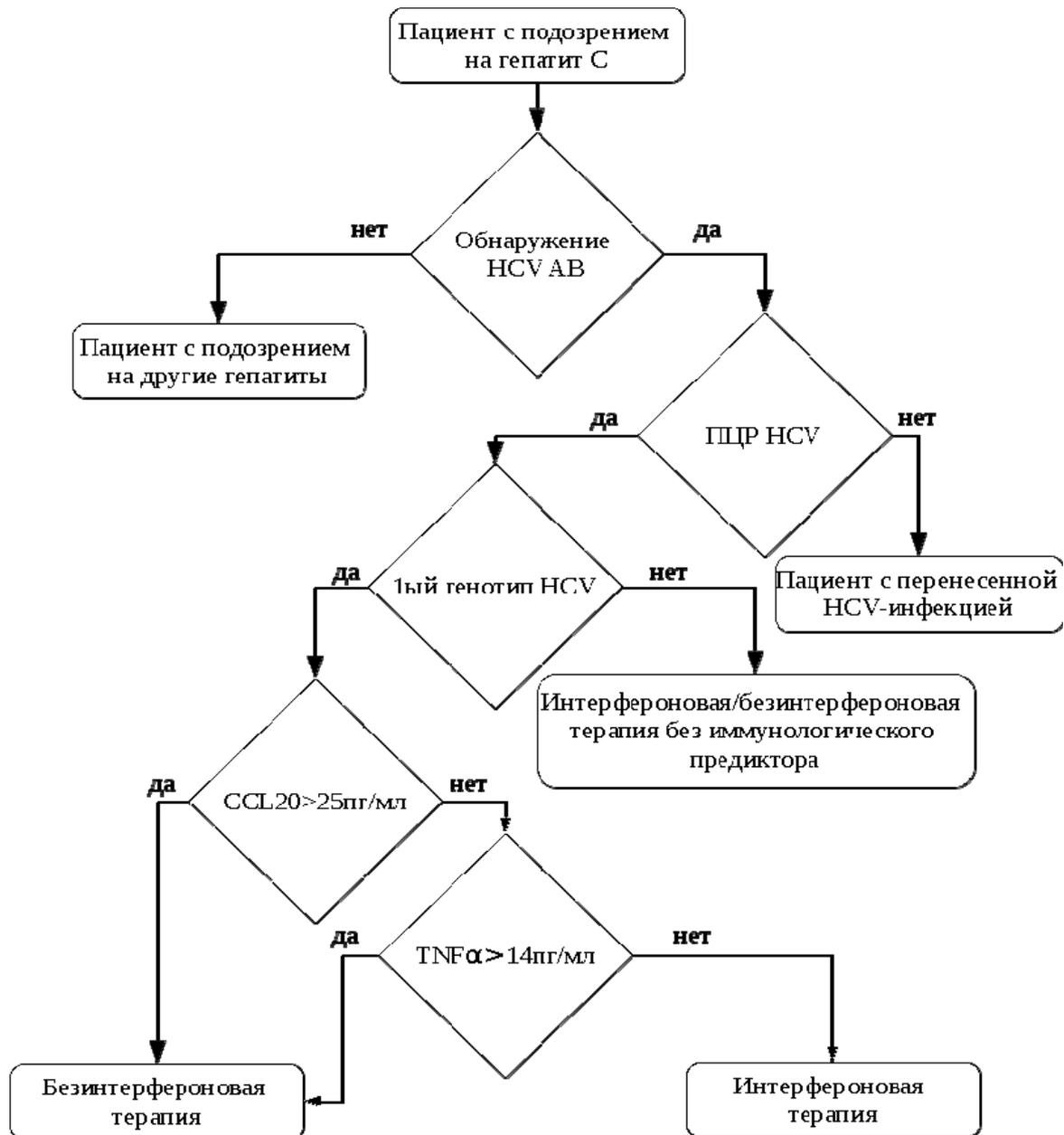


Рисунок 1 - Алгоритм подбора эффективной противовирусной терапии пациентов с ХГС

Всем пациентам проведен анализ уровня цитокинов/хемокинов $IFN2\alpha$, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $CCL2/MCP-1$, $CCL3/MIP-1\alpha$, $CCL8/MCP-2$, $CCL20/MIP-3$, $CXCL9/MIG$, $CXCL10/IP-10$, $CXCL11/ITAC$ перед ПВТ и в ее динамике.

У пациентов с F0 в ходе ПВТ произошло снижение концентрации хемокина $CXCL10/IP-10$ ($p=0,025$). Причем, если его концентрация на старте ПВТ была в 6,8 раза выше показателей контрольной группы, то к окончанию – лишь в 1,7 раза.

У пациентов с F3-F4 наблюдалась аналогичная картина изменений концентрации хемокина CXCL10/IP-10 ($p=0,00015$). Перед началом терапии его концентрация в 11,4 раза превышала таковую в группе условно здоровых лиц, а к окончанию – в 3,7 раза.

Таким образом, снижение уровня хемокина CXCL10/IP-10, не зависящего от стадии фиброза печени в ходе ПВТ, характеризует его как биомаркер воспалительного процесса.

В ходе изучения субпопуляций лимфоцитов выявлено увеличение процентного содержания Т-лимфоцитов у пациентов с F0 и повышение относительного содержания НКТ CCR6+-клеток у пациентов с F3-4, что, вероятно, подтверждает ведущую роль этих клеток в эрадикации вируса.

ВЫВОДЫ

1. В ходе клинико-иммунологического обследования пациентов с ХГС выявлено повышение концентраций цитокинов/хемокинов ($TNF\alpha$, CCL20/MIP-3 α , CXCL11/ITAC) вне зависимости от стадии заболевания, уровня вирусной нагрузки, клинической симптоматики и установлена корреляционная зависимость степени выраженности фибротических изменений в ткани печени с концентрацией хемокина CXCL9/MIG и активностью цитолиза.
2. В динамике проведения ПВТ с использованием интерферона у достигших непосредственного вирусологического ответа пациентов, инфицированных ВГС 1-го генотипа без фиброза печени, характерно снижение уровня хемокина CXCL11/ITAC при повышении уровня цитокина $TNF\alpha$, а для пациентов с фиброзом печени - повышение хемокина CCL2/MCP-1.
3. У пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа), достигших непосредственного вирусологического ответа в ходе ПВТ с использованием интерферона, обнаружены увеличение содержания CTL и NK-клеток, несущих на своей поверхности хемокиновый рецептор CXCR3+, и снижение содержания В-лимфоцитов с CXCR3+ рецептором у пациентов без фиброза печени. У пациентов с разными стадиями фиброза было обнаружено увеличение содержания CXCR3+ NK и CCR6+ НКТ клеток.
4. Прогностическими биомаркерами эффективности ПВТ с использованием интерферонов являются цитокины/хемокины CCL20/MIP-3 α и $TNF\alpha$, позволяющие

предсказать результат терапии с высокой чувствительностью и специфичностью метода: для CCL20/MIP-3 α – 91% и 80% и для TNF α – 56% и 100% соответственно.

5. Во время проведения ПВТ у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) при использовании безинтерфероновой схемы основным биомаркером, характеризующим снижение воспалительного процесса в печени, являлся хемокин CXCL10/IP-10, снижение концентрации которого в динамике терапии не зависело от наличия или отсутствия фиброза печени.

6. У пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) с выраженным фиброзом печени, получивших безинтерфероновую ПВТ, выявлено повышение относительного содержания CCR6+ NKT-клеток во время терапии, а без фиброза - тенденция к повышению относительного содержания Т-лимфоцитов.

7. Разработан алгоритм, основанный на определении исходного содержания в плазме крови двух биомаркеров из семейств цитокинов/хемокинов TNF α и CCL20/MIP-3 α , который позволяет с высокой информативностью прогнозировать результат противовирусной терапии при применении схемы с использованием препаратов интерферона у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для решения вопроса о выборе оптимальной схемы этиотропной терапии у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) разработан алгоритм на основе определения исходного содержания TNF α и CCL20/MIP-3 α в плазме крови, при повышенной концентрации которых следует назначать схемы ПВТ, включающие ПППД.

2. Во время проведения этиотропной терапии пациентам с ХГС (ВГС 1-го генотипа) с использованием ПППД рекомендовано определение концентрации хемокина CXCL10/IP-10, снижение которого к четвертой неделе терапии является контролем ее эффективности.

3. При проведении ПВТ с использованием препаратов интерферона дополнительными критериями эффективности на 12-й неделе являются:

- при отсутствии фиброза печени - повышение уровня TNF α и снижение концентрации хемокина CXCL11/ITAC

- с различными стадиями фиброза печени - повышение концентрации хемокина CCL2/MCP-1.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты данного исследования указывают на возможность использования иммунологических показателей в качестве предиктора эффективности этиотропной терапии, что может стать основой для проведения дальнейших исследований пациентов с ХГС, инфицированных ВГС 3а и 2-го генотипов, распространенных на территории Российской Федерации.

Представляет интерес возможность более широкого исследования иммунологических биомаркеров в ходе лечения различными комбинациями ПППД с целью определения предикторов результата безинтерфероновой терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

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

3. Арсентьева, Н. А. Содержание цитокинов и хемокинов в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом С / Н. А. Арсентьева, А. В. Семенов, Н. Е. Любимова, В. В. Басина и др. // Российский иммунологический журнал. – 2015. - Т. 9, №18. - С. 83-92.

4. Елезов, Д. С. Анализ популяций Т-хелперных клеток памяти экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С / Д. С. Елезов, И. В. Кудрявцев, Н. А. Арсентьева, В. В. Басина и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015. – Т. 160, №8. - С. 204-208.

5. Арсентьева, Н. А. Хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и их лиганды в печени и крови больных хроническим вирусным гепатитом С / Н. А. Арсентьева, А. В. Семенов, Н. Е. Любимова, Ю. В. Останкова, Д. С. Елезов, И. В. Кудрявцев, В.

В. Басина и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015. – Т. 160, №8. - С. 218-222.

6. Семенов, А. В. Роль цитокинов и хемокинов в лабораторной диагностике хронического вирусного гепатита С / А. В. Семенов, Н. А. Арсентьева, Н. Е. Любимова, С. В. Тюленев, В. В. Басина и др. // Клиническая лабораторная диагностика. - 2015. – Т. 60, № 8. - С. 45—51.

7. Арсентьева, Н. А. Уровень содержания цитокинов и хемокинов в плазме крови больных хроническим гепатитом С / Н. А. Арсентьева, А. В. Семенов, Н. Е. Любимова, В. В. Басина и др. // В книге: Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – 2015. – С. 23.

8. Басина, В. В. Содержание малых субпопуляций лимфоцитов у пациентов, получивших противовирусную терапию при хроническом гепатите С / В. В. Басина, Н. А. Арсентьева, А. В. Семенов и др. // Журнал инфектологии. - 2016. – Т. 8, №52. - С. 21.

9. Басина, В. В. Мониторинг содержания Т- и В-лимфоцитов с CXCR3 и CCR6 рецепторами в процессе противовирусной терапии при хроническом гепатите С / В. В. Басина, О. К. Бацунов, Н. А. Арсентьева и др. // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19, №5. - С. 210.

10. Басина, В. В. Особенности экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 на лимфоцитах в периферической крови больных с возвратной HCV-инфекцией в процессе противовирусной терапии / В. В. Басина, Н. А. Арсентьева, Н. Е. Любимова и др. // В книге: Актуальные вопросы инфекционной патологии. Тезисы III Межрегионального Форума специалистов совместно с заседанием профильной комиссии Министерства здравоохранения Российской Федерации, по специальности «Инфекционные болезни». – 2018. – С. 28-29.

11. Арсентьева, Н. А. CXCR3+ и CCR6+ субпопуляции клеток-киллеров при хроническом гепатите С и ВИЧ-инфекции / Н. А. Арсентьева, О. К. Бацунов, В. В. Басина и др. // В книге: Актуальные вопросы инфекционной патологии юга России. Материалы XI научно-практической конференции, посвященной 115-летию ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» министерства здравоохранения Краснодарского края. – 2018. – С. 20-22.

12. Басина, В. В. Клинико-иммунологическая характеристика пациентов с хроническим гепатитом С во время противовирусной терапии в безинтерфероновом режиме / В. В. Басина, А. А. Сухорук, Н. А. Арсентьева и др. // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т.99, № 5. - С. 760-765.

13. Эсауленко, Е. В. Клинический опыт безинтерфероновой терапии хронического гепатита С после трансплантации печени / Е. В. Эсауленко, А. А. Сухорук, В. Б. Мусатов, Г. В. Каченя, В. В. Басина // *Инфекционные болезни.* – 2018. – Т.16, № 3. - С. 79-86.

14. Басина, В. В. Особенности экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 и их лигандов в периферической крови больных хроническим гепатитом С во время проведения противовирусной терапии с использованием пегилированных интерферонов / В. В. Басина, Н. А. Арсентьева, О. К. Бацунов и др. // *Медицинская иммунология.* – 2019. – Т. 21, №1. - С. 107-120.

15. Басина, В. В. Эффективность и безопасность препарата нарлапревир при хроническом гепатите С в реальной клинической практике / В. В. Басина, С. Е. Калач, Н. В. Тюренкова и др. // *Журнал инфектологии.* – 2019. - Т.11, №4. – С. 65-71.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|-------------------|---|
| АлАТ | – Аланинаминотрансфераза |
| АсАТ | – Аспартатаминотрансфераза |
| ВГС (HCV) | – Вирус гепатита С |
| ВОЗ (WHO) | – Всемирная организация здравоохранения |
| ВН | – Вирусная нагрузка |
| ГГТП | – Гамма-глутамилтранспептидаза |
| НВО | – Непосредственный вирусологический ответ |
| ПВТ | – Противовирусная терапия |
| ПЕГ-ИФН (PEG-IFN) | – Пегилированный интерферон – альфа |
| ПППД | – Препараты прямого противовирусного действия |
| ПТИ | – Протромбиновый индекс |
| РНК (RNK) | – Рибонуклеиновая кислота |
| УЗИ | – Ультразвуковое исследование |
| ХГС (ГС) | – Хронический гепатит С |
| F | – Стадия фиброза по шкале METAVIR |
| CCR | – CC chemokine receptor (рецептор СС-хемокинов) |
| CXCR | – CXC chemokine receptor (рецептор СХС-хемокинов) |
| CTL | – Cytotoxic T lymphocytes (цитотоксические лимфоциты) |

| | |
|--------------|---|
| NK-клетка | – Natural killer cell (киллерная клетка) |
| Th | – T helper (Т – хелпер) |
| TNF α | – Tumor necrosis factor α (фактор некроза опухоли α) |
| NKT | – Natural killer T cell (киллерная Т-клетка) |