

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «САНКТ-
ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПАСТЕРА»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

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 и аллергология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Эсауленко Елена Владимировна

доктор медицинских наук,

академик РАН, профессор

Тотолян Арег Артёмович

Санкт-Петербург – 2020г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 Современные представления об этиотропной терапии хронического гепатита С: влияние на состояние иммунного статуса пациентов и прогностические критерии эффективности (обзор литературы).....	15
1.1 Основные этапы совершенствования этиотропной терапии и предикторы эффективности терапии	15
1.2 Динамика иммунологических показателей у пациентов с хроническим гепатитом С на фоне этиотропной терапии	28
1.3 Особенности иммунологического ответа на этиотропную терапию у пациентов с иммунодепрессивным состоянием.....	34
ГЛАВА 2 Материалы и методы исследования.....	42
2.1 Общая характеристика обследованных пациентов.....	42
2.2 Методы исследования.....	44
2.2.1 Клинико-лабораторное и инструментальное обследование.....	44
2.2.2 Иммунологическое исследование.....	46
2.3 Используемые лекарственные препараты.....	48
2.4 Методы статистической обработки полученных данных.....	49
ГЛАВА 3 Клинико-лабораторная и иммунологическая характеристика пациентов с хроническим гепатитом С	51
3.1 Клинико-лабораторная характеристика	51
3.2 Характеристика иммунологических показателей	56
3.3 Характеристика иммунологических показателей пациентов с учетом стадии заболевания.....	62
ГЛАВА 4 Клинико-иммунологическая оценка эффективности ПВТ с использованием интерферонового режима терапии	68
4.1 Клинико-лабораторная характеристика пациентов во время ПВТ.....	68

4.2 Особенности содержания цитокинов/хемокинов в плазме крови пациентов во время ПВТ.....	76
4.3 Особенности содержания субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6, в периферической крови пациентов во время ПВТ.....	81
4.4 Сравнительный анализ иммунологических показателей у пациентов, достигших и не достигших вирусологического ответа перед проведением ПВТ с использованием интерферона.....	89
ГЛАВА 5 Клинико-иммунологическая оценка эффективности ПВТ с использованием безинтерферонового режима терапии.....	96
5.1 Клинико-лабораторная характеристика пациентов во время проведения ПВТ.....	96
5.2 Особенности содержания цитокинов/хемокинов в плазме крови пациентов во время ПВТ.....	105
5.3 Особенности содержания популяций лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6, в периферической крови пациентов во время ПВТ.....	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ	126
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	128
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АлАТ	– аланинаминотрансфераза
АсАТ	– аспартатаминотрансфераза
БВО	– быстрый вирусологический ответ
ВГН	– верхняя граница нормы
ВГС (НСV)	– вирус гепатита С
ВН	– вирусная нагрузка
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ВРВП	– варикозное расширение вен пищевода
ВОЗ	– всемирная организация здравоохранения
ГГТП	– гамма-глутамилтранспептидаза
ГС	– гепатит С
ГЦК	– гепатоцеллюлярная карцинома
ЖВП	– желчевыводящие пути
ИМТ	– индекс массы тела
ИФА	– иммуноферментный анализ
МДС	– маниакально-депрессивный синдром
НВО	– непосредственный вирусологический ответ
НИИ	– научно-исследовательский институт
НО	– нет ответа
НЯ	– нежелательные явления
ОТП	– ортотопическая трансплантация печени
ПЕГ-ИФН	
(PEG-IFN)	– пегилированный интерферон – альфа
ПППД	– препараты прямого противовирусного действия
ПТИ	– протромбиновый индекс
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РВО	– ранний вирусологический ответ
РНК	– рибонуклеиновая кислота

РФ	– Российская Федерация
СНЯ	– серьёзные нежелательные явления
ССС	– сердечно-сосудистая система
УВО	– устойчивый вирусологический ответ
УЗИ	– ультразвуковое исследование
ФГДС	– фиброгастродуоденоскопия
ХВГ	– хронический вирусный гепатит
ХГС	– хронический гепатит С
ЩФ	– щелочная фосфатаза
F	– стадия фиброза по шкале METAVIR
W	– неделя противовирусной терапии
CCR	– CC chemokine receptor (рецептор СС-хемокинов)
CXCR	– CXC chemokine receptor (рецептор СХС-хемокинов)
CTL	– cytotoxic T lymphocytes (цитотоксические лимфоциты)
IP-10	– IFN γ inducible protein 10 (Интерферон-гамма индуцируемый белок – 10)
NK-клетка	– natural killer cell (естественная киллерная клетка)
Th	– T helper (Т-хелпер)
TNF α	– tumor necrosis factor α (фактор некроза опухоли α)
NKT	– natural killer T cell (естественная киллерная Т-клетка)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) инфицированность возбудителями вирусных гепатитов в мире составляет около одного миллиарда человек. Гепатит С (ГС) распространен во всем мире, на его долю приходится более 170 млн. человек, что соответствует 3% населения земного шара [1,4,7]. Наиболее часто он встречается в регионах ВОЗ Восточного Средиземноморья и Европейском, в которых распространенность в 2015г., согласно оценочным данным, составила 2,3% и 1,5% [3]. Активность эпидемического процесса ГС поддерживается за счет хронических форм. 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 (1999 г.) до 2018 года его доля в общей структуре хронических вирусных гепатитов увеличилась с 54,8 % до 77,6 % [2,8,17]. ХГС является заболеванием, входящим в перечень социально значимых заболеваний Российской Федерации (РФ) [18]. Летальность при ХГС связана с формированием у пациентов цирроза печени или гепатоцеллюлярной карциномы [113], которые, согласно мировой статистике, формируются в 20-40% случаев при прогрессировании заболевания в течение 15-20 лет [34]. Наиболее часто пациенты инфицируются в молодом и зрелом возрасте (30-39 лет) [16]. С учетом рекомендаций ВОЗ [5] вопрос о снижении заболеваемости ХГС в настоящее время является актуальным как для глобального здравоохранения [122], так и российского.

ГС, в отличие от гепатита В, является не управляемой методами специфической профилактики инфекцией [89,138]. Следовательно, достигнуть значимого снижения заболеваемости возможно только посредством проведения этиотропной терапии (противовирусной, ПВТ), которая в данном случае является профилактической мерой, ведущей к сокращению источников ВГС [66].

На сегодняшний день ПВТ ХГС пегилированными интерферонами и рибавирином в сочетании с ингибиторами протеаз остается утвержденным стандартом терапии, рекомендованным российскими клиническими рекомендациями [19,33].

Эффективность терапии составляет до 85%, ее можно повысить за счет купирования возникающих нежелательных явлений и индивидуального подхода к назначению ПВТ [90,105]. Возможность применения новых комбинаций препаратов для проведения ПВТ увеличила эффективность и сократила длительность ее проведения [30]. Несмотря на это, применение ПВТ у некоторых пациентов недостаточно изучено и может вызывать мутации вируса, приводящие к резистентности к препаратам.

Наиболее часто у практических врачей возникает вопрос оптимального выбора схем ПВТ, поскольку приходится учитывать как экономические аспекты, так и эффективность, и безопасность терапии. Поэтому прогноз эффективности терапии с использованием интерферона остается актуальным и в настоящее время.

В связи с этим попытки прогнозировать эффективность ПВТ ХГС на этапе ее планирования не теряют актуальности. Ряд иммунологических показателей периферической крови, а именно маркеры из семейства цитокинов/хемокинов, а также определенные субпопуляции иммунокомпетентных клеток, могут быть рассмотрены в качестве возможных предикторов эффективности ПВТ.

Степень разработанности темы исследования

Зарубежные авторы сообщают о результатах своих исследований, направленных на обнаружение предиктора результата ПВТ в различных режимах. На этапе планирования терапии ХГС (ВГС 1 генотипа) в качестве предикторов ПВТ принято использовать факторы пациента (пол, возраст, сопутствующие заболевания, наличие вредных привычек), вируса (генотип, вирусная нагрузка, наличие мутаций) и заболевания (степень выраженности фиброза печени). В настоящее время активно идет поиск клинико- генетических предикторов. Если

полиморфизм гена IL28B используется в клинической практике, то другие изучаются. Их влияние на эффективность ПВТ с использованием препаратов интерферонов неоднозначны [23,62,155,156]. Учитывая, что многие из генов способны запускать механизмы врожденного иммунитета при взаимодействии с ВГС, то 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. Наиболее часто на роль маркера воспаления печени и предиктора результата ПВТ выдвигают хемокин CXCL10/IP-10 [39,113,140,141,164]. Лишь в части работ актуальными маркерами являются CXCL11/ITAC и CCL20/MIP3 α . [163]. Имеются разрозненные данные о повышении или понижении концентрации вышеперечисленных хемокинов в ходе ПВТ.

Возможность уточнить роль некоторых хемокинов в иммунопатогенезе ХГС в ходе его терапии послужила мотивацией к проведению настоящего исследования.

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 хронического гепатита С 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 хроническим гепатитом С, с учетом стадии фиброза печени в динамике проведения ПВТ с использованием интерферонсодержащих схем (PEG-IFN).

3. Определить клинико-иммунологические предикторы эффективности ПВТ хронического гепатита С с использованием PEG-IFN.

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

5. На основании клинико-иммунологических показателей разработать алгоритм выбора оптимальной схемы этиотропной терапии хронического гепатита С 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 иммуннологическом ответе на противовирусную терапию.

Установлена связь между этапом проведения ПБТ 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 интерферона. Выявлено увеличение концентрации хемокина CCL2/MCP-1 у пациентов с различной стадией фиброза печени в начальной точке терапии. У пациентов, достигших УВО, получавших ПБТ 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 ПБТ ХГС (ВГС 1-го генотипа) с использованием интерферонов.

Разработан алгоритм подбора режима этиотропной терапии при 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 хронического гепатита С 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 концентрации 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. ПБТ 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 хронического вирусного гепатита С (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 и молекулярно-генетических.

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».

Авторы: Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Басина В.В., Козлов К.В., Эсауленко Е.В., Жданов К.В., Тотолян А.А.

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.

ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С: ВЛИЯНИЕ НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Основные этапы совершенствования этиотропной терапии и предикторы эффективности терапии

На начальном этапе развития этиотропной терапии (в начале 90-х годов прошлого века) стали использовать интерферон- α (ИФН- α) короткого действия для лечения пациентов с ХГС. Применение препаратов интерферона короткого действия в качестве монотерапии приводило к очень низкой эффективности терапии ХГС. Это позволило достичь УВО лишь 2–7% не получавших ранее лечение пациентов [14].

Активный поиск препаратов, увеличивающих эффективность ПВТ, привел специалистов к применению интерферона короткого действия в сочетании с другими препаратами. Использование рибавирина (РБВ), препарата, являющегося аналогом нуклеозидов, в комбинации с препаратом интерферона короткого действия увеличило достижение устойчивого вирусологического ответа (УВО) до 42%. В этот же период (1990-2000гг.) начали для ПВТ использовать индукторы ИФН-ов (амиксин, неовир, циклоферон), иммуномодуляторы (цитокины: интерлейкин-1, интерлейкин-2, интерлейкин-12, а также фактор некроза опухоли $\text{TNF}\alpha$) [6,9,30].

В 2000-х годах ученые разработали препараты интерферона длительного – пролонгированного действия, измененные в результате присоединения молекулы полиэтиленгликоля. Данный модифицированный интерферон (ИФН) получил название пегилированного интерферона (ПЕГ-ИФН). Достижение пациентами с ХГС УВО значительно увеличилось в сравнении с предыдущей схемой. При применении ПЕГ-ИФН в сочетании с рибавирином УВО составил 42-54%

[56,79,98,160]. С 2000-х годов и по настоящее время в РФ для пациентов применяется эта схема терапии [22], однако ее эффективность остается в пределах 46 - 51% при ВГС 1-го генотипа и до 80% при 3 и 2 генотипах по данным разных исследователей [28,52,65,56]. При своевременно начатой терапии острого вирусного гепатита С (ОВГС) эффективность была значительно выше. Если противовирусная терапия была начата у пациента с ОВГС, то риск перехода в хроническую форму заметно снижался [25,33].

Частота возникновения гепатоцеллюлярной карциномы у лиц с цирротической стадией хронического гепатита в сравнении с пациентами с ХГ стадией фиброза 0, 1, 2 и 3 в 30 раз выше [124]. В литературе отсутствует единое мнение о возможности регресса фиброза печени после проведения этиотропной терапии [65]. В исследовании Самма С. и соавторов сообщается, что в ходе обследования 1013 пациентов с ХГС, получавших курс этиотропной терапии, представленной ПЕГ-ИФН в сочетании с рибавирином, наблюдались изменения стадии фиброза печени: уменьшение было обнаружено у одной четверти пациентов и отсутствие изменений фиброза печени - у 63,6%. Был выявлен регресс фиброза печени у пациентов с компенсированным циррозом печени (из 198 пациентов у 33,8%; с F4 до F3/F2 в 24,2% случаев и до F1 в 9,6% случаев) [51].

Применение ПЕГ-ИФН в сочетании с рибавирином в разы увеличило достижение УВО у пациентов с ХГС в сравнении с предыдущей схемой (УВО от 20-30% до 50-80%) [13,25,56,68,80,144,149,158,159], однако так же, как и при предыдущей схеме ПВТ, не изменило частоту и степень выраженности нежелательных явлений (НЯ). Препараты, используемые для этиотропной терапии, имеют разнонаправленные механизмы действия и могут вызывать различные НЯ.

Рибавирин — препарат, сходный по строению с гуанозином, который ингибирует инозин монофосфат дегидрогеназу (ИМФ), что приводит к выраженному снижению уровня внутриклеточного гуанозин трифосфата (ГТФ), что, в свою очередь, сопровождается подавлением синтеза белков вируса и РНК

ВГС. Для этиотропной терапии пациентов с ХГС рекомендовано применение рибавирина в сочетании с препаратами интерферона.

Одной из наиболее однородных групп на сегодняшний момент являются пегилированные интерфероны. Существует два основных класса препаратов с доказанной эффективностью [20,22]: пегинтерферон альфа-2а и пегинтерферон альфа-2b. Добавление полиэтиленгликоля в интерферон (пегилирование) увеличивает период полураспада интерферона в сравнении с его оригинальной формулой. Оба препарата вводят подкожно один раз в неделю и применяют только для лечения ХГВ и С.

Пегинтерферон альфа-2b является соединением, содержащим молекулу монометоксиполиэтиленгликоля и интерферона альфа-2b. Молекулярная масса соединения 31.3 кДа. Данный ПЕГ-ИФН выделяют из *E. coli*, содержащей генно-инженерную плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую человеческий интерферон альфа-2b. Многочисленные исследования показали четкую видоспецифичность интерферона альфа-2b к специфическим рецепторам на поверхности клеток мишеней. Однако было показано, что чувствительностью к лейкоцитарному человеческому интерферону 1-го типа также обладают некоторые виды обезьян, например макаки-резус. Терапевтическое действие интерферона основано на сочетании различных эффектов. Так, интерферон, действуя на рецепторы клеток-мишеней, запускает цепочку внутриклеточных реакций, приводящих к активации выработки ферментов, с помощью которых происходит снижение репликативной активности вируса гепатита С внутри пораженных гепатоцитов, а также замедление пролиферативной активности клеток. Интерферон способен активировать клетки врожденного и адаптивного иммунитета: повышать активность дендритных клеток и макрофагов, усиливать цитотоксичность лимфоцитов. Интерферон пролонгированного действия угнетает репликацию вируса *in vitro* и *in vivo*. Действие рекомбинантного альфа-2b интерферона остается до конца не изученным, тем не менее, полагают, что препарат изменяет метаболизм клеток организма. Это приводит к подавлению

репликации вируса; если она все же происходит, то образующиеся вирионы не способны выйти из клетки.

В связи с тем, что применение данного режима терапии не приводило к достижению УВО у всех пациентов [32], возникла необходимость поиска эффективных предикторов результата терапии.

К отрицательным предикторам результата ПБТ со стороны макроорганизма были отнесены пожилой и старческий возраст, мужской пол, наличие сопутствующей соматической патологии: сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца, нарушение ритма, психические заболевания в анамнезе, избыточный вес, вредные привычки (табакокурение, избыточное употребление алкогольных напитков и наркотических веществ) [64,65,67], со стороны вируса: 1-й и 4-й генотип, различные мутации.

Одним из иммунологических предикторов результата ПБТ явилось наличие генотипа ТТ для полиморфизма rs12979860 и генотипа GG для полиморфизма rs8099917 гена IL28B (IFN λ). Данные генотипы выделялись как предикторы положительного результата лечения [14,81,154].

Однако генетический полиморфизм в гене IL28B, кодирующем интерферон лямбда 3 (IFN λ 3), у пациента приводит к большим различиям в эффекте лечения. У пациентов, инфицированных ВГС 1 геотипа, имеющих обычные аллели гена IL28B, вероятность излечения выше, чем у других. Наличие ТТ генотипа по однонуклеотидным полиморфизмам rs12979860 гена IFN λ 3 связано с высвобождением рецептора NKG2A, оказывающего угнетающее действие на НК-клетки, что объясняет возможную роль IFN λ 3 в угнетении ответа НК-клеток на ВГС – инфекцию [81]. Генотип по однонуклеотидным полиморфизмам rs12979860 обуславливает отсутствие ответа на противовирусную терапию ПЕГ-ИФН +рибавирин [26].

В литературе широко представлено мнение, что CXCL10/IP-10 является предиктором результата ПБТ. В некоторых работах исследователей публикуются данные о положительной корреляционной связи между уровнем CXCL10/IP-10 и

ответом на терапию с использованием препаратов пегилированного интерферона и рибавирина [39,113,140,164].

Также в литературных источниках встречаются данные о возможности использования хемокина CCL20/MIP3 α в качестве предиктора результата ПВТ в интерфероновом режиме. В статье Yamauchi K. и соавторов был проведен анализ концентраций хемокина CCL20/MIP3 α у 25 пациентов в динамике ПВТ с использованием интерферонов. Оказалось, что концентрация данного хемокина значительно выше у пациентов, впоследствии не достигших УВО, по сравнению с успешно достигшими к 14 дню терапии [163].

Следующим этапом в развитии этиотропной терапии стали принципиально новые противовирусные препараты, появившиеся сравнительно недавно [150]. В 2011 году в США были запатентованы новые препараты прямого противовирусного действия (ПППД), направленные на элиминацию ВГС (боцепревир и телапревир) [31,40,167].

ВГС относится к РНК-содержащим вирусам. Информация, которую содержит геном ВГС, кодирует последовательность примерно 3 тысяч аминокислотных остатков. ВГС содержит 10 вирусных белков: структурных - С, Е1, Е2, р7 и неструктурных - NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, и NS5B [47]. Исследователи считают, что белки, являющиеся катализаторами процесса репликации вируса, – это неструктурные белки (NS), которые образуются вследствие расщепления полипротеина.

Неструктурные белки могут стать мишенью для некоторых противовирусных препаратов. Так, известно, что белок NS3 обладает активностью протеолитического фермента, в результате которой происходит образование других неструктурных белков. Белок NS3 обладает молекулярной массой 68 кДа, содержит на N-концевом домене сериновую протеазу, а на С-концевом домене - РНК-зависимую АТФазу. Белок NS4 берет на себя функции ко-фактора активности NS3 в качестве сериновой протеазы.

Таким образом, NS3/NS4A сериновая протеаза ВГС отвечает за разделение вирусного полипротеина на структурные части. Далее происходит сборка

вириона. Современные препараты противовирусного действия могут оказывать угнетающее действие на NS3/NS4A сериновую протеазу вируса. В результате данного подавляющего эффекта препаратов становится невозможным разделение полипротеина вируса на структурные части и дальнейшая его сборка [90,91].

На настоящий момент заключительным этапом развития этиотропной терапии стало использование комбинаций препаратов ПППД (возможность применения которых появилась в 2013 году) для лечения пациентов с ХГС [21,128]. Впервые такие схемы стали использовать в США, затем в Европейских государствах и в России. Препараты ПППД в настоящее время по механизму действия разделяют на 4 класса: ингибиторов протеазы ВГС (ИП), нуклеозидных ингибиторов полимеразы, ненуклеозидных ингибиторов полимеразы (ИПОЛ) и ингибиторов неструктурного 5А фрагмента полипротеина вируса гепатита С (И5А) [29,30].

Ингибиторы протеазы первого поколения представлены следующими препаратами:

1. Боцепревир, также являющийся ингибитором NS3 протеазы вируса гепатита С, ковалентно, но обратимо связывается с альфа-кетоамидной функциональной группой активного центра сериновой протеазы NS3, что приводит к ингибированию репликации вируса в пораженных вирусом гепатита С гепатоцитах пациента. Эффективен в случаях поражения 1-м генотипом ВГС [131].

2. Телапревир – синтетический противовирусный препарат, также является ингибитором сериновой протеазы NS3/4A. Механизм действия заключается в подавлении активного центра фермента ВГС–протеазы путем связывания с активным сериновым остатком фермента с помощью функциональной группы альфа-кетоамида, что приводит к торможению репликации вируса в пораженных клетках. Препарат эффективен только для терапии пациентов с 1-м генотипом ВГС.

Опыт применения препаратов теллапревир и боцепревир выявил множество нежелательных последствий различной степени тяжести. Ингибиторы протеазы

первого поколения (боцепревир и телапревир) в настоящее время не используются из-за развития НЯ [19,20,33,40,65,131].

Ингибиторы протеазы второго поколения представлены следующими препаратами:

3. Нарлапревир, являющийся представителем этого класса (производится в России). Следует отметить, что класс препаратов ИП действует только в отношении вируса 1-го генотипа. Препарат может быть применен у лиц старше 18 лет с различными стадиями фиброза печени, исключая цирротическую (класс В и С по Чайлд Пью). Используют нарлапревир лишь в комбинации с интерфероном, рибавирином и ритоновиром. Последний препарат является фармакокинетическим усилителем препарата – ингибитора протеазы.

4. Асунапревир — ингибитор NS3/4A протеазы ВГС. Препарат, так же, как и предыдущие, активен только в отношении 1-го генотипа ВГС. Используется при лечении пациентов старше 18 лет в сочетании с другим препаратом ППД, рекомендован для применения с даклатасвиром – ингибитором полимеразы ВГС (ИПОЛ). Также возможно применение вместе с ПЕГ-ИФН и рибавирином.

5. Симепревир — ингибитор протеазы NS3 второго поколения. Средство разрешено использовать с мая 2014 года. Данный препарат обладает активностью в отношении 1-го, 2-го и 4-го генотипов ВГС. В качестве монотерапии не применяется. Рекомендовано использование симепревира в сочетании с другими ПППД как ингибиторами протеазы, так и ингибиторами полимеразы. Например, с препаратом софосбувир. Возможно применение в комбинации с ПЕГ-ИФН и рибавирином. Курс применения 3 месяца в дозировке 150 мг в сутки [90].

Препараты, относящиеся к ИПОЛ:

Эти препараты блокируют образование фермента, полимеразы ВГС, тем самым оказывая угнетающее действие на репликацию вирусных частиц. Полимераза относится к неструктурным белкам ВГС - NS5A и NS5B. Ингибирующие полимеразу противовирусные препараты делятся на нуклеозидные/нуклеотидные и ненуклеотидные.

6. Софосбувир - нуклеозидный ингибитор РНК-полимеразы NS5B. В настоящее время он используется для 1-го, 2-го, 3-го и 4-го генотипов вируса [78,169]. Препарат разрешен к применению в январе 2014 года. Софосбувир, используемый в комбинации с рибавирином и симепревиrom (ИП), пригоден только при терапии ВГС 1-го генотипа [99]. В США и Европе софосбувир применяют вместе с препаратами И5А- даклатасвиром или ледипасвиром [151]. Такая схема является пангенотипичной.

Курс применения софосбувира в сочетании с ПЕГ-ИФН и рибавирином для 1-го генотипа ВГС составляет 3 месяца, а в сочетании с рибавирином для 2-го и 3-го генотипов ВГС – 3 и/или 6 месяцев, по 400 мг в сутки. При испытании препарата было отмечено незначительное количество НЯ [30,127].

7. Даклатасвир (Даклинза™) — ингибитор РНК-полимеразы И5А у пациентов с хроническим гепатитом С 1-го, 2-го, 3-го и 4-го генотипов у взрослых. Препарат разрешен к использованию с августа 2014 года. Даклатасвир является препаратом, обладающим пангенотипичной активностью. В качестве монотерапии ХГС не применяется. Рекомендован в сочетании с другимиПППД: ИПОЛ – софосбувиром ± рибавирин; - асунапревиром ± рибавирин, а также с ПЕГ- ИФН и рибавирином. Курс приема препарата 3 – 6 месяцев [153].

В настоящее время в соответствии с действующими клиническими рекомендациями возможно применение следующих комбинаций противовирусных препаратов, включающих в себя препарат интерферон: [65].

1) Комбинация ПЕГ-ИФН + рибавирин + симепревир рекомендована для терапии 1-го генотипа ВГС. По данным литературных источников комбинация ПЕГ-ИФН+рибавирин+симепревир также обладает высокой эффективностью [90,139].

Клинические исследования (ATTAIN) показали достижения УВО (в 70% случаев) даже у пациентов, имевших в анамнезе попытку ПВТ с помощью ПЕГ-ИФН и рибавирина [138]. Исследования в рамках клинических испытаний этих препаратов (QUEST-1 и QUEST-2) выявили достижение УВО в 81% случаев в группе пациентов, получивших терапию впервые [90,112].

2) Комбинация ПЕГ-интерферон + рибавирин + нарлапревир используется также для терапии 1-го генотипа ВГС.

3) Комбинация ПЕГ-интерферон + рибавирин + софосбувир является пангенотипичной схемой. По результатам клинических исследований (TARGET) препарата софосбувир частота достижения пациентами с ХГС 1-м генотипом в ходе ПВТ УВО была высокой и составила 89% среди больных, получавших этиотропную терапию впервые. У пациентов с цирротической стадией заболевания, относящихся к классу А по Чайльд-Пью, УВО составил 80% [106]. Также высокая эффективность данной комбинации показана в исследовании (TARGET 2.0), где УВО составил 85% у пациентов с ХГС. У больных с цирротической стадией класс А по Чайльд-Пью, получивших терапию УВО, был достигнут в 70% случаев [93]. Еще одно исследование данной схемы терапии (TRIO) показало высокий УВО у пациентов, ранее не получавших этиотропной терапии, как без цирротической стадии заболевания, так и с цирротической (81%) и достижение УВО в 77% случаев у пациентов, ранее получавших терапию ПЕГ-ИФНом и рибавирином. Высокая частота достижения УВО – 96% – была показана среди пациентов со 2-м генотипом ВГС, не получавших этиотропной терапии ранее в исследовании (LONESTAR-2). УВО у пациентов с 3-м генотипом ВГС, имевших неудачную попытку ПВТ ранее с помощью ПЕГ-ИФН и рибавирина, при использовании этой схемы был 83% по результатам исследования (LONESTAR-2) [106].

Схемы, содержащие в своем составе один из ПППД, значительно увеличили эффективность терапии, но остается группа «сложных» пациентов, которым не удастся достичь УВО. Поэтому поиск предиктора результата ПВТ остается актуальным. Часть исследователей предлагает на роль предиктора результата ПВТ иммунологический показатель – хемокин CXCL10/IP-10.

По данным авторов Marra F. и соавторов снижение уровня CXCL10/IP-10 у пациентов, достигших после лечения УВО, наблюдается уже к концу первого месяца. Эта закономерность выявлялась в обеих группах пациентов (получавших препараты интерферона, рибавирин и один из препаратов прямого

противовирусного действия (телапривир или боцепривир) и получавших терапию с помощью комбинации ПППД) [115].

В настоящее время стало возможным применение комбинированных препаратов прямого противовирусного действия.

В России с 21 апреля 2015 г., а в США с декабря 2014 г. для лечения ХГС, вызванного вирусом 1-го генотипа, начали применение препарата, который является комбинацией трех ПППД: дасабувир — нуклеозидный ингибитор полимеразы NS5B; омбитасвир — ингибитор NS5A; паритапревир — ингибитор протеазы NS3/4A; ритонавир — фармакокинетический усилитель. Действие препарата ритонавир, приводящее к увеличению времени полувыведения ингибитора протеазы из плазмы крови пациента, вызывает подавление системы ферментов цитохрома р 450 [77].

Комбинированная схема препаратов (дасабувир + омбитасвир + паритапревир + ритонавир) назначается взрослым больным ХГС (ВГС 1-го генотипа) в течение 4-8-12 недель (в случае иммунодепрессивного состояния пациента – 24 недели), применяется для лечения либо самостоятельно, либо в сочетании с рибавирином.

Частота достижения УВО у пациентов, получающих в качестве терапии ПППД, с различной стадией фиброза печени вплоть до цирроза, колеблется от 91 до 100% [36,63,69,70,132,168].

В настоящее время в соответствии с действующими клиническими рекомендациями возможно применение следующих комбинаций прямых противовирусных препаратов [65].

Для 1-го генотипа:

1) Омбитасвир + паритапревир + ритонавир + дасабувир ($\pm$ рибавирин)

Данные препараты входят в состав одного комбинированного препарата, что делает прием лекарства более комфортным для пациентов. Исследования этого препарата и реальная клиническая практика показали высокую эффективность у пациентов с 1-м генотипом ВГС. Исследование SAPPHIRE-I выявило достижение УВО в 95% случаев для 1a генотипа вируса и 98% для 1b

[69]. Подобное клиническое испытание PEARL-IV показало достижение УВО в 90% случаев у пациентов, использовавших в качестве лечения монотерапию, и в 97% случаев при сочетании исследуемого препарата с рибавирином. В данной работе в исследовании PEARL-III пациентов разделили на две группы: получавшие монотерапию и терапию в сочетании с рибавирином. Достижение УВО в обеих группах составило 99% [70]. Короткий курс приема препарата составил 3 месяца для пациентов с выраженным фиброзом печени и 2 месяца для пациентов с отсутствием фиброза печени.

2) Софосбувир + симепревир ($\pm$ рибавирин)

Эффективность этой схемы лечения оказалась высокой среди групп пациентов с различной степенью фиброза [61]. Так по результатам исследования COSMOS частота достижения УВО была 93-96% (схема без рибавирина и с рибавирином) у пациентов с отсутствием фиброза и умеренно выраженным фиброзом и у пациентов с выраженным фиброзом - 93-100% ($\pm$ рибавирин). Еще одно исследование TARGET 2.0 показало высокую эффективность и безопасность этой комбинации препаратов. УВО составил в общем 89%, причем у пациентов без цирроза печени УВО – 92%, а с циррозом – 87% [93].

Рекомендованы к применению во врачебной практике пангенотипичные схемы терапии ХГС:

1) софосбувир + даклатасвир ($\pm$ рибавирин)

Частота УВО у пациентов, не получавших ранее лечения данной комбинацией, составила 100% как в комбинации с рибавирином, так и без него. Курс терапии длился 6 месяцев [153]. Эта комбинация оказалась возможной для применения у пациентов с циррозом печени в компенсированной стадии. Эффективность и безопасность схемы высокая. Частота УВО по данным исследователей составила 92% [65]. Применение данной схемы показало как высокую эффективность и безопасность, так и удобный короткий курс приема препаратов. По данным исследования (ALLY-3) частота УВО у пациентов, получавших лечение ранее, составила 94%, а у получавших впервые - 97% [123].

2) Софосбувир + рибавирин

Высокая эффективность и безопасность комбинации препаратов была доказана в исследовании FISSION. Проводилось наблюдение за пациентами, получавшими ПВТ впервые в жизни, и оказалось, что частота возникновения УВО у пациентов с циррозом составила 83%, а без цирроза - 97% [107]. В группе больных с циррозом печени УВО достигал 34%, а без цирроза – 61%. Длительность курса терапии составляла 3 месяца (исследование FISSION) [107]. При увеличении длительности курса лечения до 6 месяцев процент УВО у пациентов увеличивался, в группе больных с циррозом печени до 92%, а в группе без цирроза печени до 94% (исследование VALENCE) [169].

В настоящее время благодаря работе специалистов по генной инженерии было проделано много исследований, связанных с изучением патогенеза ХГС и разработкой новых препаратов и различных схем ПВТ. Однако остается еще много неразрешенных проблем, связанных с развитием НЯ, наличием противопоказаний к терапии, отсутствием 100% эффективности препаратов [22].

Исследователи выделяют ряд мутаций ВГС, наличие которых может являться предиктором результата этиотропной терапии. Мутации, в результате которых происходит замена аминокислоты, расположенной в целевых белках вируса, влияют на восприимчивость вируса к лекарственным препаратам [73,74]. Высокое генетическое разнообразие и уровень мутаций дают возможность вирусу выработать устойчивость к препаратам, что приводит к снижению клинической эффективности ПППД (ингибиторов протеазы и полимеразы). Известно, что мутации, приводящие к возникновению лекарственной резистентности, могут развиваться первично при отсутствии в анамнезе терапии ПППД [157]. Клиническая значимость лекарственной резистентности ВГС, выявленная в ходе проведенных клинических испытаний и реальной практики врачей, описана в работе Esposito I. и соавторов [63]. Исследователи Poveda E. и Garcia F сообщают, что возникновение мутаций ВГС, находящихся в положениях 36, 54, 55, 155 и 156, зависит от генотипического подтипа. Так, при наличии ВГС 1a подтипа мутации чаще обнаруживаются в положениях 36 и 155, а при 1b подтипе – в положениях 36, 54, 55 и 156. Выделяют мутации, обеспечивающие вирусу

высокую степень резистентности к противовирусным препаратам, - V36M+R155K и A156F/T/V (более чем 25-кратное увеличение), и более низкую - V36A/G/M, T54A/S, R155G/K/M/T и A156S (увеличение в 3-25 раз). Исследователи описывают мутации, приводящие к резистентности к препарату телупревил, как редкие (менее 1%). Также описывают высокую степень перекрестной резистентности к препаратам ингибиторов протеаз [133].

В работе Poveda E. и соавторов сообщается, что ряд мутаций в конкретных генотипах/подтипах ВГС предполагает тестирование лекарственной резистентности перед назначением этиотропной терапии. Так, высокая устойчивость вируса к симепревиру у пациентов с ВГС 1a генотипа, возникающая в 19-48% случаев, связана с полиморфизмом Q80K [134]. Имеются сообщения о редко встречающейся мутации, суть которой состоит в замене S282T в вирусной полимеразе, что обеспечивает устойчивость вируса к 2'-С-метилованным нуклеотидным аналогам – ингибиторам полимеразы [82]. Мутации L31M и Y93H, обуславливающие устойчивость к ингибиторам NS5A вирусной полимеразы, часто встречаются среди первого генотипа вируса (6-12%). Данные полиморфизмы были обнаружены у пациентов, имевших генотип CC по IL-28B и не ответивших на терапию, представленную ПЕГ-ИФН и рибавирином. Являются ли ранее изученные мутации актуальными для режима терапии, исключающего препараты интерферона, - неизвестно, и это обстоятельство требует дальнейших исследований [134].

Исследователи Selzner N., Lin J.C. и соавторы пришли к выводу о том, что показателем уменьшения воспалительного процесса в тканях печени является снижение концентрации CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAK в динамике терапии у пациентов, достигших УВО в ответ на ПВТ в безинтерфероновом режиме (лечение проводилось с помощью даклатосвира и асунапревира). Несмотря на это, к окончанию терапии концентрации этих показателей все равно не изменялись до нормальных значений [111,145].

Последнее время наиболее актуальным является поиск прогноза эффективности ПВТ в зависимости от особенности иммунологического ответа организма хозяина.

1.2 Динамика иммунологических показателей у пациентов с хроническим гепатитом С на фоне этиотропной терапии

В ответ на внедрение в макроорганизм патологического агента (вирусы, бактерии, грибы) иммунная система отвечает развитием воспаления в тканях и органах и активацией специфического иммунитета. Ведущая роль в активации звеньев иммунной системы отводится медиаторам иммунного процесса – цитокинам/хемокинам. Иммунная система организма ответственна за активную эрадикацию ВГС, а также оказывает значительное влияние на ход ПВТ. Термин «хемокин» происходит от словосочетания «хемотаксические цитокины», они способствуют хемотаксису или миграции различных типов клеток в очаг поражения. По своему строению хемокины представляют собой катионные белки с низкой молекулярной массой 8-12 кДа. Все они имеют несколько консервативных остатков цистеина. Описано четыре семейства хемокинов: CXC, CC, C и CX3C. К семейству CXC-хемокинов относятся те представители, которые имеют два цистеиновых остатка (C), разделенных одной аминокислотой (X). Семейство CC-хемокинов имеют два соседних цистеиновых остатка. Следующая группа хемокинов имеет единственный дисульфидный мостик и цитоплазматический C конец для передачи сигнала – это C-хемокины, и группа, представитель которой имеет два остатка цистеина, разделенных тремя аминокислотами – CX3C-хемокины. Концентрации трех представителей CXC класса – CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAK, а также CCL20/MIP3a хемокин (представитель семейства CC-хемокинов) повышаются в периферической крови пациентов с ХГС [161]. Задача хемокинов заключается как в активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета и привлечении их в очаг воспаления, так и торможение данного процесса [147,155]. Поэтому

исследователи отводят хемокинам большую роль в физиологических и патологических процессах в организме. Иммунные процессы, возникающие в ходе противовирусной терапии, не до конца изучены. На настоящем этапе изучения иммунопатогенеза ВГС считается, что повреждение гепатоцитов лишь в небольшой мере является следствием цитопатического действия вируса. В основном разрушение гепатоцитов обусловлено активацией иммунокомпетентных клеток [10,15,41,104], часть из которых имеют цитотоксическую активность (NK-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты) в отношении как пораженных вирусом, так и непораженных гепатоцитов [118,129,130,146]. За счет влияния ВГС на клетки организма хозяина происходит подавление иммунной системы, что проявляется в виде незавершенного Т-клеточного ответа против клеток, пораженных ВГС. Такое взаимодействие вируса и макроорганизма объясняет высокую частоту хронизации заболевания, а также развитие цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. ВГС оказывает подавляющее действие как на компоненты врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. В борьбе с ВГС принимают участие следующие компоненты врожденного иммунного ответа: NK-клетки, NKT-клетки, дендритные клетки, а также система цитокинов/хемокинов [92]. Действие интерферонов, ингибирующих репликацию ВГС, оказывается приостановленным в результате взаимодействия вируса с иммунной системой. При адаптивном иммунном ответе важная роль отводится на CTL, которые взаимодействуют с вирусными пептидами в контексте главного комплекса гистосовместимости 1-го класса (МНС-I) [140]. В результате контакта пораженных ВГС гепатоцитов с субпопуляцией CTL происходит запуск механизма уничтожения гепатоцита с помощью апоптоза. Апоптоз активируется с помощью цитолитического и нецитолитического механизмов. Цитолитический механизм основан на повреждении гепатоцитов системой гранзимов и перфоринов, а при нецитолитическом механизме основное действие на пораженную клетку хозяина оказывается с помощью цитокинов ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и др.). У пациентов с выраженным Т-клеточным ответом происходит полная элиминация ВГС после

перенесения ОВГ. Вследствие взаимодействия ВГС и иммунной системы макроорганизма происходит угнетение активности CTL белками вируса. В результате чего при ХГС формируется иммунологическая толерантность к антигенам вируса [100]. Так, у пациентов с ХГС снижается уровень CTL в сравнении пациентами с ОГС, и обычно наблюдается высокая ВН. Во время успешной ПБТ происходит снижение и негativaция ВН в плазме крови и заметная активация Т-клеточного звена иммунитета, так как исчезает супрессирующее действие ВГС [137]. При ХГС наблюдается снижение выработки провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-2), активно работающих при других хронических вирусных инфекциях [103]. Имеются данные о стимуляции ВГС Т-регуляторных клеток, которые подавляют активность Т-клеток, обладающих эффекторными функциями, что приводит к снижению адаптивного иммунного ответа [104].

Увеличение выделения определенных цитокинов/хемокинов, например, IFN γ , CCL20/MIP3 α CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAK, эпителиальными клетками, гепатоцитами, Купферовскими клетками, возникает при вирусных заболеваниях печени [50,115]. Также при взаимодействии ВГС и иммунной системы макроорганизма происходит снижение продукции провоспалительных цитокинов, обладающих противовирусным действием (TNF α , IL-2) [15].

В ответ происходит миграция лейкоцитов в очаг воспаления. Большинство иммунокомпетентных клеток, обнаруживаемых в периферической крови пациентов с ХГС, несут на своей поверхности CXCR3 и/или CCR6 [11,24]. Небольшое число пациентов (5-10%) с ОГС выздоравливают без применения ПБТ. Освобождение макроорганизма от ВГС связывают с действием клеток адаптивного иммунного ответа – Т-лимфоцитами. Хемокины CXCL9 или MIG (монокин-индуцируемый IFN γ), CXCL10 или IP-10 (IFN γ -индуцирующий белок 10), CXCL11 или ITAC (интерферон-индуцируемый Т-клетками α -хемоаттрактант), CCL20/MIP3 α (макрофагальный белок воспаления) [161] привлекают в ткани печени Т-лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности CXCR3 и CCR6. Хемокины и их рецепторы, селективно

экспрессирующиеся на лимфоидных клетках иммунной системы, могут быть предложены как предикторы результата противовирусной терапии.

В части исследовательских работ предполагается, что CXCL-10/IP-10 является предиктором неудачного результата ПВТ с использованием интерферонов при ХГС [38,39,50,60]. Есть данные о CXCL-10/IP-10 как о маркере воспаления в печеночной ткани [119,166] и о том, что изменение этого показателя во время ПВТ с использованием интерферонов может предсказать исход лечения и возможность возникновения рецидива инфекции [141]. В крови пациентов увеличивается концентрация CXCL10/IP-10 после подкожного введения экзогенного интерферона. В статье Romero A.I. и соавторов сообщается о изменении концентрации CXCL10/IP-10 у 8 пациентов спустя двое суток после инъекции интерферона [141]. Оказалось, что у всех пациентов наблюдались заметные изменения концентрации хемокина CXCL10/IP-10 в сторону увеличения. Также обнаружена слабая взаимосвязь между достижением РВО и повышением концентрации CXCL10/IP-10 через двое суток после начала лечения с использованием интерферона.

Имеются сообщения, о том, что степень выраженности фибротических изменений в тканях печени коррелирует с повышением концентрации CCL2/MCP-1 у пациентов с ХГС [86,87,88,114,161], а также обнаружена связь хемокина CCL2/MCP-1 с возникновением поражения стенки кровеносных сосудов (развитием васкулитов) [37].

Исходя из рассмотренного выше иммунопатогенеза ХГС, становится понятно, что основная роль в борьбе с ВГС отводится Т-клеточному звену иммунитета, в частности Т-клеткам, обладающим цитотоксической активностью [126]. Однако в современной литературе можно найти результаты научных наблюдений, противоречащих друг другу. В работе Werner C.R. и соавторов был получен результат, где анализ изменения содержания CTL с CXCR3 при ПВТ с использованием интерферонов при ОВГС показал увеличение уровня этих клеток в начале лечения (с 0 до 3 месяцев) и уменьшения их содержания после (с 3 до 6 месяцев). В этой работе показана активация Т-клеточного звена иммунитета в

момент негативации ВН в ходе ПБТ [162]. Однако в работе Pungparong S. и соавторов констатируется факт о том, что содержание разных популяций Т-клеток понижается в ходе ПБТ острого ВГС с развитием УВО, а также выраженный ВГС–специфический Т-клеточный ответ присутствует у пациентов, развивших вирусологический прорыв в течении ПБТ [137]. С другой стороны, в работе Joshi D. и соавторов наоборот утверждается, что в ходе ПБТ с использованием интерферонов увеличивается процентное соотношение CD4+ Т-клеток у пациентов, развивших после терапии УВО, в сравнении с содержанием CD4+ Т-клеток до лечения и у пациентов с ХГС, не получивших ПБТ [94]. В своей работе Kamal S.M. и Ismail A. также докладывают о положительной связи вирусологического ответа на этиотропную терапию и содержания Т-лимфоцитов у пациентов, получавших лечение с помощью препаратов интерферона [95,96], хотя в статье Reherrmann B. не обнаруживается связь Т-клеточного ответа с результатами терапии. По данным в European Association of the Study of the Liver hepatitis C virus clinical practice guidelines исследования содержания Т-клеток в периферической крови пациентов не открывают глаза на полную картину иммунопатогенеза ХГС в динамике терапии. Полную картину можно получить, сопоставляя данные процессы с изменениями в биоптатах печени. Необходимы дальнейшие исследования для решения этого вопроса [67].

Также разнонаправленные факты освещаются в зарубежной литературе о повышении содержания В-лимфоцитов у пациентов с ХГС в тканях печени и периферической крови в сравнении со здоровыми лицами. В статье Micheloud D. и соавторов говорится об уменьшении частоты встречаемости CD27+ В-лимфоцитов с CXCR3 в периферической крови пациентов с ХГС и одновременном увеличении этих же лимфоцитов в тканях печени из-за перераспределения лимфоцитов и их концентрации вблизи очага инфекции [117]. В статье Naveau S. и соавторов имеются данные о низком содержании лимфоцитов, обладающих цитотоксической активностью (за счет CTL и NK-клеток), у пациентов с ХГС и в противоположность высокому содержанию CXCR3 В-лимфоцитов на старте ПБТ в сравнении с группой контроля [125].

Опубликованы результаты работы, свидетельствующей о том, что у пациентов с ХГС в ходе ПВТ происходит изменение содержания В-лимфоцитов. Shields P.L. и соавторы описывают увеличение процентного содержания CD81+ В-лимфоцитов у пациентов с ХГС, получавших терапию с использованием препаратов интерферона и достигших ВО. В группе больных с повышенным уровнем В-лимфоцитов, экспрессирующих CD81+ рецептор, перед проведением терапии выявлено много пациентов, не достигших УВО [147,148]. Таким образом, повышенный уровень CD81+ В-лимфоцитов до старта ПВТ может быть предиктором отсутствия достижения УВО, по мнению авторов.

Shields P.L. и соавторы проанализировали у пациентов с ХГС процентное содержание CD100+, CD68+, CD69+ В-лимфоцитов до и после проведения ПВТ с использованием препарата интерферонов. Повышенное содержание В-лимфоцитов с вышеперечисленными рецепторами у пациентов с ХГС в сравнении с контрольной группой на старте ПВТ становится вариантом нормы к ее окончанию. Таким образом, сведения о нормализации содержания В-лимфоцитов в ходе ПВТ по результатам зарубежных исследований свидетельствуют о дезактивации гуморального звена иммунитета в результате ПВТ [147].

С 2013 г. стали доступны схемы терапии с использованием только ПППД. Частота достижения УВО увеличилась до 95-100%.[102]. Значительно возросла переносимость пациентами препаратов (ПВТ) в сравнении с ПВТ с использованием интерферонов [77,99]. Прогноз результата лечения является наиболее важным в момент выбора терапии и зависит от иммунологического ответа организма, обусловленного генетическими особенностями человека. Так как цитокины/хемокины являются неизменными участниками воспалительной реакции организма в ответ на внедрение антигена и выполняют регуляторную функцию в адаптивном иммунном ответе, важным рассматривается вопрос об изучении их роли в результате ПВТ. С появлением схем противовирусной терапии, исключающих применение препарата интерферона, стало возможным лучше изучить взаимодействие ВГС и иммунного ответа организма, так как в этом случае отсутствует экзогенная стимуляция, индуцируемая IFN- α [110].

Хорошо известно, что в пораженной ВГС печени возникает устойчивое воспаление и прогрессия фиброза [120,121]. При воспалении в тканях печени увеличивается продукция хемокинов и медиаторов воспаления [145,155] и определяется активация NK-клеток, моноцитов/макрофагов печени [97,121], чаще за счет Купферовских клеток [35,45]. Анализ содержания циркулирующих биомаркеров показал целесообразность прогнозирования эффективности терапии с помощью определения показателей иммунного ответа [103,115,141]. Среди печеночных биомаркеров хемокин CXCL10, INF- γ индуцируемый протеин-10, связан с активацией воспалительных изменений в печени и стадией развития фиброза. Хемокин CXCL10 играет важную роль в патогенезе HCV-инфекции [141,164,165].

Selzner N. и соавторы сообщают о понижении уровня сывороточного CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAK в ходе терапии у пациентов, ответивших на ПВТ в безинтерфероновом режиме (лечение проводилось с помощью даклатосвира и асунапревира). Концентрации хемокинов CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAK не достигали нормальных значений к окончанию терапии. По данным работы Marra F. и соавторов не было выявлено различий в степени снижения уровня сывороточного CXCL10/IP-10 в зависимости от степени выраженности фиброза печени [114]. С другой стороны, по данным авторов Rehmann B. и соавторов наблюдалась положительная корреляция между уровнем CXCL10/IP-10 и стадией фиброза у пациентов. Авторы предлагают рассматривать CXCL10/IP-10 как неинвазивный маркер фиброза печени [140,141].

Таким образом, актуальным является изучение изменений биомаркеров воспаления печени во времени, в том числе CXCL10/IP-10, возникающих под влиянием ПВТ в безинтерфероновом режиме.

1.3 Особенности иммунологического ответа на этиотропную терапию у пациентов с иммунодепрессивным состоянием

Пациентам, находящимся в терминальной стадии ХГС, по жизненным показаниям проводят трансплантацию печени. Однако у данной группы

пациентов происходит реинфицирование трансплантата с последующим развитием фиброза печени. У пациентов наблюдается продолжающаяся вирусная репликация, что приводит к формированию цирротической стадии и в дальнейшем к летальному исходу. Причём уровень вирусемии превышает в 50-100 раз относительно таковой до операции. У 50-70% пациентов после трансплантации прогрессирование фиброза значительно ускоряется в связи с иммуносупрессией [75,76,116,124]. У около 44% пациентов развивается цирроз в пересаженном органе через 5-10 лет после трансплантации печени [75,76]. После трансплантации печени у части пациентов (20-30%), не получавших этиотропную терапию, в связи с ХГС развивается цирроз печени в течении 5 лет [42,135]. Пациенты с более выраженным фиброзом трансплантата, возникшим в период первых 12 месяцев после трансплантации, имеют более высокую вероятность декомпенсации ХГС и наступления летального исхода [46,71]. На фоне иммунодепрессивной терапии после операции у части пациентов с ХГС может развиваться фиброзирующий холестатический гепатит, который при отсутствии ПВТ приводят к летальному исходу [120].

В настоящий момент пытаются выделить иммунологические маркеры ускорения развития фиброза у пациентов, имеющих в анамнезе трансплантацию донорской печени. Так, авторы [44] в своей статье сообщают, что в результате исследования уровней сывороточных хемокинов CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CCL2 у 90 пациентов, ранее перенесших трансплантацию печени, выявлено статистически значимое увеличение уровня сывороточного CXCL10 и CXCL11 через год после трансплантации с развитием фиброза до F2-3 по данным биопсии. Также были получены более отдаленные результаты. Через 3 года после операции выявлялась корреляционная связь CXCL10 с прогрессией фиброза. Уровни CXCL10 в сыворотке крови в этом исследовании были в тех же концентрациях, что и в более ранних исследованиях у пациентов с неиммунными нарушениями [39,165,166].

Таким образом, использование иммунодепрессантов не оказало влияния на экспрессию CXCL10 у данных пациентов. Прогноз ускоренного формирования

фиброза печени у пациента дает возможность оптимального выбора кандидатов для проведения противовирусной терапии у пациентов после трансплантации [44].

В небольшом исследовании с 19 пациентами, инфицированными ВГС, CXCL10 также был предложен на роль биомаркера раннего рецидива ХГС, в среднем до одного года после трансплантации печени [117].

В статье группы английских авторов [94] имеются сведения об исследовании 333 пациентов с хроническим гепатитом С после первичной трансплантации печени. Исследования проводились в период с 2000 по 2011 гг. У всех пациентов определяли содержание CXCL10 в периферической крови сразу после трансплантации и спустя 12 месяцев. Параллельно проводилось определение фиброза печени по результатам биопсии. Все пациенты были разделены по скорости прогрессирования фиброза на группу с быстрым и медленным прогрессированием. Оказалось, что уровень CXCL10 в сыворотке крови пациентов достоверно коррелирует с прогрессией фиброза печени. Было определено, что сывороточные уровни CXCL10 были значительно ниже в группе пациентов с медленной прогрессией фиброза в сравнении с группой быстро прогрессирующего фиброза. В более поздней статье авторы [58] и [83] дают оценку скорости развития цирроза печени после трансплантации и оценку потребности в ПВТ в течение 6 месяцев.

Также в статье [58] при исследовании биомаркеров прогрессии фиброза при ХГС у 72 пациентов, перенесших ранее трансплантацию печени, была показана незначительная роль сывороточного CXCL10 в прогнозе скорости развития фиброза печени. Применение после операции ПВТ и следующее за этим излечение от гепатита С предотвращает развитие цирроза печени и потерю трансплантата [43,54,59,108]. Однако, с одной стороны, безинтерфероновые схемы ПВТ способны практически вылечить гепатит С [54,72], а с другой стороны, важное значение для этих схем имеет экономическая составляющая, которая на данный момент не позволяет обеспечить широкий охват ПВТ нуждающегося населения. Поэтому наиболее важным остается выбор наиболее

нуждающихся в ПВТ кандидатов, для которых лечение будет наиболее значимым [58]. Имеются сообщения о том, что безинтерфероновые схемы лечения более эффективны при применении в первые месяцы после трансплантации печени, чем, если бы они были применены у пациентов с выраженным фиброзом F3 или циррозом печени [71].

Ранее для лечения пациентов, перенесших трансплантацию печени, применяли стандартную схему лечения, состоящую из двух препаратов: пегилированного интерферона альфа и рибавирнина. Однако эффективность такой терапии была не высока. У пациентов возникал УВО только лишь в 25-30% случаев, что в разы ниже, чем у пациентов, не получающих иммунодепрессивные препараты [84].

Наличие НЯ было гораздо выше у пациентов, имеющих в анамнезе трансплантацию печени. Это объясняется постоянным воздействием на организм препаратов иммунодепрессивной терапии. В организме человека, постоянно принимающего ингибиторы кальциневрина (циклоsporин, такролимус), наблюдается заметное снижение функции почек. При нарушении почечной фильтрации замедляется выведение рибавирина. Это приводит к увеличению гемолитических анемий у пациентов данной группы. Также применение интерферонов может привести к развитию аллоиммунного повреждения печени, что может привести к гибели пациента. [85,109,145].

На смену стандартной терапии, включавшей препараты: ПЕГ-ИФН и рибавирин, – пришли препараты прямого противовирусного действия. С появлением схем терапии, содержащих ПППД в сочетании с ПЕГ-ИФН и рибавирином, частота развития УВО у данной группы пациентов возросла до 50-70%. Однако большое количество НЯ, таких как анемия, тромбоцитопения, нейтропения, инфекции, ограничивает широкое клиническое использование такого сочетания противовирусных препаратов [49,55,136,142].

Безинтерфероновый режим ПВТ наиболее подходит для назначения у данной группы пациентов из-за сравнительно небольшого количества

возникающих НЯ, удобного перорального приема, а также короткого курса приема препаратов [53].

В статье Samuel D показано, что у пациентов с ХГС, перенесших ортотопическую трансплантацию печени (ОТП), получавших ПВТ в безинтерфероновом режиме с помощью препаратов софосбувир и рибавирин, достигнут УВО в 70% (28 пациентов из 40) [143].

Ряд американских авторов докладывали о результатах своего исследования на конференции Американского общества по изучению заболеваний печени в 2014 г. Они исследовали пациентов, перенесших ранее ОТП и получавших ПВТ комбинацией препаратов софосбувира, ледипасвира и рибавирина, страдающих гепатитом С, вызванным 1-м и 4-м генотипами вируса гепатита С. Частота достижения УВО у пациентов с цирротической стадией класса А по Чальд-Пью была 96%, а у больных с цирротической стадией класс В по Чальд-Пью – 85%. Развитие НЯ было не значительным. Такие побочные осложнения, как синусовая аритмия, тромбоз воротной вены, анемия, являлись СНЯ.

По данным американских исследователей Brown R.S. и Levin R.B.J. были получены хорошие результаты лечения 179 больных с 1-м генотипом ВГС, перенесших ранее трансплантацию печени. Большая часть пациентов (149 человек) получали в качестве ПВТ комбинацию софосбувира и симепревира, 18% пациентов принимали софосбувир и симепревир и рибавирин, 13% пациентов – софосбувир, симепревир и пегинтрон и 7% – софосбувир с рибавирином. Анализ эффективности терапии на момент данной публикации был возможен только у 68 пациентов. Из них отсутствие вируса в крови через 4 недели после окончания ПВТ наблюдалось у 61 исследуемого, что составило 90%. С приемом препарата рибавирин было связано развитие анемии у 21% пациентов. [48,108].

В России с 21 апреля 2015 г., а в США чуть ранее - с декабря 2014 г. для лечения гепатита С, вызванного вирусом 1-го генотипа, начали применение комбинированного препарата паритапревира (ИП), омбитасвира (И5А), дасабувира (ненуклеозидный ИПОЛ), ритонавира (фармакологический усилитель). Данный препарат применяется для лечения либо самостоятельно,

либо в сочетании с рибавирином по назначению врача. Частота достижения УВО у пациентов с различным фиброзом печени вплоть до цирроза колеблется от 91 до 100% [36,69,70,132,168].

На территории РФ комбинированный препарат дасабувир, омбитасвир, паритопривир и ритонавир применяются недостаточно широко и длительно у пациентов, перенесших ОТП.

За рубежом было проведено исследование, в которое вошли 34 пациента с ВГС 1-го генотипа, подвергнутые ранее трансплантации печени, с отсутствием фиброза или умеренно выраженным фиброзом [101]. Они получали препараты паритопревивр, омбитасвир, дасабувир и ритонавир в течение 24 недель. УВО наблюдался в 97% случаев (33 из 34 человек). Вирусологического прорыва до 24 недели терапии не наблюдалось ни у одного из 33 пациентов. В ходе терапии наблюдались следующие НЯ: слабость отмечали 50% пациентов, головную боль – 44% и умеренный сухой кашель – 32%. У небольшой части пациентов (15%) была обнаружена анемия, которая была скорректирована препаратом эритропоэтин. НЯ были доступны медикаментозной коррекции и не привели к отмене препаратов. У одного из 34 пациентов в связи с появившимися нарушениями памяти, нарастающим чувством тревожности и появившейся пятнистой сыпью ПВТ была прервана на 18-й неделе приема препарата. Однако и у этого пациента УВО был получен. Все пациенты получали иммунодепрессивную терапию: 29 человек принимали такролимус, 5 – циклоспорин. Дозы циклоспорина уменьшались в 5 раз от начальной. Прием такролимуса в дозе 0,5 мг принимался с частотой 1 раз в неделю. Контроль концентрации кальционеврина в периферической крови пациентов проводился с регулярностью 1 раз в 2 недели во время ПВТ. В случае необходимости дозы иммунодепрессантов изменялись [101].

В Европе и США рекомендуют для лечения ХГС (ВГС 1-го генотипа) у пациентов, имеющих в анамнезе трансплантацию печени, схемы, состоящие из ПППД: нуклеотидный ИПОЛ (софосбувир) с И5А (даклатасвиром или лепипасвиром) или с ИП (симепревиром) ± рибавирин; комбинированный препарат паритапревивр/ритонавир, омбутасвир, дасабувир ± рибавирин. Данные

схемы лечения приводят к достижению УВО в 95-97% случаев. Положительным моментом предлагаемых схем терапии является низкая частота встречаемости НЯ. К отрицательным можно отнести высокую необходимость изменения дозы препаратов кальционеврина из-за взаимодействия ПППД и иммунодепрессантов [29].

Часть данных пациентов с высокой концентрацией ВГС в периферической крови получали ПВТ. В процессе лечения также определяли уровень CXCL10 в сыворотке крови. В результате CXCL10 был определен как независимый предиктор устойчивого вирусологического ответа у пациентов, имеющих в анамнезе трансплантацию печени [94].

Таким образом, изучение содержания концентраций цитокинов/хемокинов: TNFa, CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3a, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC и экспрессии хемокиновых рецепторов CCR6+, CXCR3+ лимфоцитами в периферической крови больных ХГС в разные периоды ПВТ, а также поиск предикторов результата ПВТ в интерфероновом и безинтерфероновом режимах является очень актуальным и перспективным. Это, несомненно, поможет врачу в выборе препаратов ПВТ.

В заключение можно сказать, что, поскольку ХГС в настоящее время является наиболее распространенным инфекционным заболеванием, поражающим органы желудочно-кишечного тракта и приводящим к развитию цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (что приводит к летальному исходу), а разработки вакцин на настоящий момент не привели к положительному результату [138], основной путь в борьбе с данной инфекцией связан с введением различных схем этиотропной терапии. Применяются различные схемы, включающие препараты интерферонов для пациентов с разными генотипами ВГС, эффективность которых достигает 49-85%, а безопасность не исключает формирования как нежелательных явлений, так и серьезных нежелательных явлений, приводящих к назначению препаратов, корректирующих возникшие патологические состояния, или к коррекции схем терапии и даже ее прекращению. На смену интерферонсодержащих схем пришли схемы,

включающие комбинации препаратов, оказывающих на вирус прямое противовирусное действие. Эффективность и безопасность терапии возросла до 87 — 98%, что позволило расширить рекомендации по приему препаратов данных схем. Так, терапию смогли получать пациенты с цирротической стадией ХГС в отсутствии фазы декомпенсации. Однако есть пациенты, у которых после курса ПППД не наблюдался УВО. Этот факт связан с различными мутациями ВГС, которые обеспечивают фармакоустойчивость вируса, и особенностями иммунологического ответа организма человека на внедрение ВГС. Изучение данных особенностей дает возможность предсказать результат действия различных схем ПВТ ХГС и наиболее оптимально произвести подбор схемы терапии, что должно привести к достижению УВО. Дальнейшее изучение особенностей иммунного ответа у пациентов с ХГС до начала и в течение терапии является актуальным в ходе решения задач по элиминации ХГС.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика обследованных пациентов

Исследование проводилось в 2014 – 2017 гг. на кафедре инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Педиатрический Медицинский Университет» Минздрава России, клиническая база кафедры – СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П.Боткина» и ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Пастера» Роспотребнадзора.

В исследование было включено 123 пациента (60 мужчин и 63 женщины) в возрасте от 21 до 71 года (средний возраст $40,7 \pm 10,6$ лет), часть из которых, в последующем, наблюдались в ходе противовирусной терапии.

Перечень необходимых условий для включения в исследование:

- мужчины и женщины в возрасте от 18 лет
- диагноз ХГС, подтвержденный обнаружением антител к ВГС и РНК ВГС - информированное согласие на участие в исследовании

Критериями невключения в исследование были:

- острый гепатит С
- суперинфекция другими гепатотропными вирусами
- ВИЧ инфекция
- другие хронические заболевания печени (первичный билиарный цирроз, гемохроматоз, аутоиммунные гепатиты гепатолентикулярная дегенерация, склерозирующий холангит, алкогольная болезнь печени)
- алкогольная болезнь
- наркомания
- психические заболевания (шизофрения, МДС)
- суб- и декомпенсированная сопутствующая соматическая патология: ССС, дыхательной, мочевыделительной, а также желудочно-кишечного тракта.

- беременность и лактация
- заболевания, являющиеся противопоказанием для проведения ПБТ

Группу контроля составляли условно здоровые лица (26 человек), у которых отсутствовали признаки заболеваний печени (клинические и лабораторные), а также соматические заболевания.

У пациентов и условно здоровых лиц оценивали содержание цитокинов TNF α , IFN α 2, IFN γ , хемокинов CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC и субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6 в плазме крови.

У части пациентов оценивали содержание цитокинов/хемокинов и субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6 в плазме крови в динамике ПБТ.

Пациенты, получавшие этиотропную терапию, были разделены на две группы:

- 1 группа - пациенты, получавшие ПБТ в интерфероновом режиме
- 2 группа - пациенты, получавшие ПБТ в безинтерфероновом режиме.

В группах пациентов были выявлены различия по возрасту ($p=0,029$), но не по половой принадлежности ($p=0,19$)

Общая характеристика пациентов всех групп показана в таблице 1.

Все этапы исследования соответствуют законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам исследовательских организаций, а также одобрены Этическим Комитетом при ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №2 от 11.12.2013г.)

Таблица 1 – Общая характеристика пациентов, получивших ПБТ

Параметр		Все пациенты	Пациенты, получавшие ПБТ		
Общее количество пациентов, n		123	1-я гр.	2-я гр.	Всего
			41	14	55
Средний возраст, лет		40,7±10,6	39,5±10,0	49,6±9,8	42,8±10,7
Гендерный состав	Мужчины, n/%	60/48,8	28/71	4/29	32/57
	Женщины, n/%	63/51,2	13/29	10/71	23/43

Все пациенты с ХГС перед проведением ПБТ подписали информированное согласие, составленное в соответствии со статьями 13, 19, 20, 22 Федерального Закона РФ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011г. N 323-ФЗ [27].

2.2 Методы исследования

2.2.1 Клинико-лабораторное и инструментальное обследование

Во время проведения исследования у всех пациентов уточняли анамнестические данные, эпидемиологический анамнез (сроки инфицирования, возможные пути заражения, указания на проведенное противовирусное лечение ранее, сроки возникновения рецидива заболевания и т.д.). Пациентам был проведен объективный осмотр по системам и органам, выполнены антропометрические измерения (рост, вес, ИМТ)

Исследуемым пациентам выполняли клинический, биохимический анализы крови, протеинограмму, коагулограмму. Так же был проведен скрининг инфекционных заболеваний, который включал определение маркеров вирусных гепатитов А, В, С, ВИЧ-инфекции, молекулярно-генетическое и молекулярно-биологическое исследование ВГС.

У пациентов проводилось определение уровня альфа-фетопroteина для исключения гепатоцеллюлярной карциномы.

Инструментальное исследование включало ультразвуковую диагностику (УЗИ) органов брюшной полости, забрюшинного пространства и щитовидной железы, фиброгастродуоденоскопию (ФГДС) и непрямую эластометрию печени.

Анализ клинических показателей крови был выполнен на гематологическом анализаторе PCE-90 (фирма «ERMA», Япония). Были определены содержания гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, лейкоцитарной формулы.

Референсные значения показателей являются вариантом нормы, определенной в клинической лаборатории СПб ГБУЗ КИБ им С.П. Боткина.

Анализ биохимических показателей крови, состоял из определения уровней общего билирубина, общего белка, альбумина, активности ферментов: аспаратаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), проводился фотометрическим и потенциометрическим способами на автоматическом биохимическом анализаторе Arhitect c8000 производства фирмы Abbot Laboratories (США). Референсные значения показателей являются вариантом нормы определенной в лаборатории биохимии СПб ГБУЗ «КИБ им С.П. Боткина».

Показатели коагулограммы (ПТИ, фибриноген) определяли на полуавтоматическом коагулометре Start 4 производства фирмы Roche (Швейцария).

У всех пациентов выявляли антитела к вирусу гепатита А (anti-HAV IgM), антитела и антигены вируса гепатита В (HBsAg, anti-HBcore Ab (Ig M, Ig G)). Исследования выполнены методом ИФА с помощью тест-систем Вектогеп А Ig М, Вектогеп В – HBs – антиген и ВектоHBcAg-антитела производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Антитела к вирусу гепатита С определяли [57] с помощью тест-системы Anti-HCVAb на иммунохимическом анализаторе Arhitect 2000 SR производства фирмы Abbot Laboratories (США).

Молекулярно-биологическое исследование ВГС проводили с целью выявления РНК в плазме крови и определения уровня вирусной нагрузки (качественный и количественный анализ) методом обратной транскрипции и

полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием тест-систем «АмплиСенс HCV-FRT» (качественная детекция) и «АмплиСенс HCV-монитор-FRT» (количественная детекция). Обе тест-системы производства ЦНИИЭ (Россия).

Молекулярно-генетическое исследование ВГС выполняли с помощью тест-системы «Ампли Сенс-50-R HCV-генотип» производства ЦНИИЭ (Россия).

Выявление антител к ВИЧ проводили методом ИФА с использованием тест-системы Genscreen Ultra HIV Ag/Ab производства Bio-Rad Laboratories (Франция).

Инструментальное обследование пациентов состояло из:

- УЗИ органов брюшной полости, забрюшинного пространства щитовидной железы, которое проводили всем пациентам с использованием ультразвукового сканера АЛОКА с селекторным датчиком 3,5 МГц.

- непрямой эластометрии печени, которую выполняли на аппарате FibroScan (Франция).

- ФГДС проводили посредством волоконного эндоскопа GIF Q 10 фирмы Olympus (Япония).

При возникновении нежелательных явлений ПБТ пациентам предоставляли консультации смежных специалистов (эндокринолог, невропатолог, психиатр).

2.2.2 Иммунологическое исследование

Производился забор венозной крови у 84-х пациентов. Цельную кровь помещали в вакуумные пробирки с антикоагулянтом К₂ЭДТА (2 шт.). Первую пробирку использовали для цитофлюориметрического исследования, которое было сделано в первые сутки после забора крови. Кровь во второй пробирке в течении 10 минут подвергали центрифугированию при 1500 об/мин для отделения плазмы. Плазму для дальнейшего хранения замораживали при температуре – 80°С и помещали в пробирки типа «Эппендорф».

Определяли концентрации следующих цитокинов/хемокинов в плазме крови методом мультиплексного анализа: TNF α , IFN α 2, IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC.

Сравнительный анализ проводили с группой условно здоровых лиц, данные по которой считали вариантом нормы, определенной в лаборатории молекулярной иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

В данной работе для диагностики были использованы коммерческие тест-системы «Milliplex MAP» фирмы Millipore (США). Они основаны на технологии Luminex xMAP (Luminex, США) с применением магнитных микросфер Milliplex Mag. Концентрацию цитокинов/хемокинов измеряли с помощью прибора Luminex MAGPIX (Luminex, США).

Тест-системы использованные в работе основаны на технологии xMAP. В ней применяется иммунофлуоресцентный анализа и используются магнитные микросферы с применением моноклональных антител к двум различным эпитопам цитокина или хемокина.

Состав субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3 определяли в периферической крови пациентов методом проточной цитофлуориметрии.

Данный метод исследования был проведен на цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с использованием различных комбинации моноклональных антител меченных различными флуорохромами.

1) Для определения частоты встречаемости основных популяций лимфоцитов: CD3-FITC CD16-PE CD56-PE CD45-PerCPCy5.5 CD4-PE-Cy7 CD19-APC;

2) Для определения В-, Т- и CD4+Т-лимфоцитов, несущих хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3: CD19-FITC CD3-PE CCR6-PE-Cy7 CXCR3-APC CD4-APC-Cy7;

3) Для определения Т-, CD8+Т-, NK- и NKT- лимфоцитов, несущих хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3: CD3-FITC CD16-PE CD56-PE CCR6-PE-Cy7 CXCR3-APC CD8-APC-Cy7.

Окрашивание проб для цитометрического анализа проводили по стандартной методике.

Содержание лимфоцитов с хемокиновыми рецепторами в периферической крови у условно здоровых лиц (26 человек) принимали в качестве вариантов нормы, определенной в лаборатории молекулярной иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

2.3 Используемые лекарственные препараты

55 пациентов получали для лечения разные схемы противовирусных препаратов и в связи с этим были разделены на группы. См. таблицу 1.

Пациенты 1-й группы (n=41) получали ПВТ с использованием препаратов интерферона.

Первая часть пациентов (12 человек) получали один из пролонгированных препаратов интерферона – пегинтерферона альфа-2а (Пегасис[®], производство F. Hoffmann – La Roche Ltd., Швейцария) или пегинтерферона альфа-2b (Пегинтрон[®], производство Schering-Plough, Бельгия) в комбинации с рибавирином (Рибавирин, производство Вертекс, Россия).

Вторая часть (29 человек) получали один из пролонгированных препаратов интерферона: пегинтерферон альфа-2а (Пегасис[®], производство F. Hoffmann – La Roche Ltd., Швейцария) или пегинтерферон альфа-2b (Пегинтрон[®], производство - Schering Plough, Бельгия) в комбинации с рибавирином (Рибавирин, производство Вертекс, Россия; Ребетол[®] производство Schering Plough, Бельгия) и один из препаратов прямого противовирусного действия - ингибиторов сериновой протеазы NS3/4A - телапревир (Инсиво, производство Янссен-Силаг С.п.А., Италия), нарлапревир (Нарлапревир, производство Р-ФАРМ, АО), симепревир (Совриад, Янссен-Силаг С.п.А., Италия).

2-я группа пациентов (n=14) получала ПВТ в безинтерфероновом режиме.

Пять пациентов получали комбинацию препарата - ингибитора полимеразы комплекса репликации неструктурного белка (NS5A) ВГС – даклатасвир (Даклинза, производства компании Bristol-Myers Squibb, США) и ингибитора

сериновой протеазы NS3/4A - асунапревир (Сунвепра, производство компании Bristol-Myers Squibb, США)

Девяти пациентам назначили комбинированный препарат, содержащий дасабувир (нуклеозидный ингибитор РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса, кодируемой геном NS5B), омбитасвир (ингибитор белка NS5A вируса гепатита С), паритапревир (ингибитор протеазы вируса гепатита С NS3/4A), ритонавир (фармакокинетический усилитель, увеличивающий максимальную концентрацию паритапревира в плазме крови) (Викейра Пак, производства AbbVie Ireland (дасабувир) и Fournier Laboratories Ireland (омбитасвир + паритапревир + ритонавир), Ирландия.

В качестве критериев оценки эффективности противовирусной терапии ХГС использовали:

Быстрый вирусологический ответ (БВО) – отрицательный тест на РНК ВГС в крови после 4-й недели терапии, сохраняющийся до окончания терапии.

Ранний вирусологический ответ (РВО) – отрицательный тест на РНК ВГС в крови после 12-й недели терапии, сохраняющийся до окончания терапии.

Устойчивый вирусологический ответ (УВО) – неопределяемый уровень РНК ВГС в крови через 12 или 24 недели после окончания терапии (в зависимости от режима терапии).

Непосредственный вирусологический ответ (НВО) - отрицательный тест на РНК ВГС в крови на момент окончания терапии.

2.4 Методы статистической обработки полученных данных

Статистическая обработка данных проведенного исследования была выполнена с помощью пакета программ R. Это пакет программ с открытым исходным кодом для статистической обработки данных.

При помощи теста Колмогорова-Смирнова оценивался вид распределения количественных признаков в выборках и дальнейший анализ данных проводился с его учетом. В случае распределения, отличающегося от нормального, вместо

среднего значения и нормального отклонения вычисляли медиану и интерквартильные интервалы (Me; 25/75).

Для определения статистически значимого изменения медиан до, во время и после ПВТ был использован критерий Фридмана с уровнем значимости $p < 0,05$.

При сравнении данных в группах ответивших и не ответивших на ПВТ пациентов использовался тест Манна-Уитни, с уровнем значимости $p < 0,05$.

При сравнении данных в группах пациентов с различной выраженностью фиброза использовался критерий Краскела-Уоллиса, с уровнем значимости $p < 0,05$.

Для определения степени корреляции клинических, биохимических, лабораторных, иммунологических показателей пациентов с ХГС использовали двухсторонний ранговый корреляционный анализ Спирмена.

Для разработки алгоритма выбора эффективной схемы ПВТ было произведено сравнение концентраций исследованных цитокинов/хемокинов в группах ответивших и не ответивших на терапию пациентов с помощью теста Манна-Уитни. Это позволило отобрать иммунологические критерии эффективности терапии.

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

В пакете R было построено дерево решений, на основании которого был разработан алгоритм выбора эффективной схемы противовирусной терапии ХГС.

ГЛАВА 3 КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

3.1 Клинико-лабораторная характеристика

Было обследовано 123 пациента с диагнозом ХГС, которые обращались за консультативной помощью в поликлиническое отделение СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П.Боткина» и впоследствии прошли углубленное обследование в отделении дневного стационара с целью расширенной диагностики и определения тактического подхода к выбору терапии ХГС.

Среди обратившихся за диагностической помощью пациентов было 63 мужчины и 60 женщин. На момент обращения в поликлиническое отделение жалоб не предъявляли 54 пациента (44%). Выявление этих пациентов было связано со случайным обнаружением антител к ВГС (Anti-HCV) во время обследования по поводу трудоустройства или при подготовке перед каким-либо хирургическим вмешательством.

У остальных 69 пациентов (56%) на момент обращения имелись различные жалобы. Проявлениями астено-вегетативного синдрома были: слабость и быстрая утомляемость – у 29 пациентов (23,5%), головная боль – у двоих (1,6%), бессонница – у двоих (1,6%). Диспептический синдром проявлялся тяжестью в правом подреберье (чаще после приема пищи) – у 27 человек (22%), изменением стула – у 4 человек (3,2%) (трое жаловались на диарею до 3-4 раз в сутки, и один – на склонность к запорам), частой изжогой – у 4 пациентов (3,2%), стойким снижением аппетита – у двоих (1,6%) и тошнотой – у двух пациентов (1,6%).

При изучении корреляционной зависимости были получены данные о связи длительности заболевания и возраста пациентов ($r=0,315$; $p<0,01$). С увеличением возраста пациентов увеличивается длительность заболевания.

Во время проведения физикального обследования у 111 пациентов была обнаружена гепатомегалия (90,2%), наличие которой было подтверждено с

помощью ультразвукового исследования. Прямая корреляционная зависимость была получена между возрастом пациента и гепатомегалией ($r=0,386$; $p<0,001$). Также при осмотре у 19 пациентов (15,5%) была обнаружена гепатоспленомегалия. Причем у 12 (9,7%) спленомегалия обнаружена при физикальном обследовании и подтверждена ультразвуковой диагностикой, а еще у 7 (5,7%) только с помощью УЗИ диагностики.

Также была обнаружена корреляционная связь между наличием у пациентов с гепатомегалией спленомегалии ($r=0,270$; $p<0,05$). Наличие у 15% больных гепатоспленомегалии подтверждает широко известные данные об увеличении селезенки у 10-15% пациентов с ХГС.

У всех пациентов (100%) отсутствовали яркие проявления экскреторно-билиарного и холестатического синдромов - желтуха кожных покровов, слизистых и кожный зуд. Но у сравнительно небольшого числа пациентов ($n=20$; 16,3%) при осмотре отмечалась субиктеричность склер, что указывало на наличие субклинически протекающего процесса вирусного поражения печени.

Таким образом, полученные в результате исследования данные свидетельствуют о бессимптомности или малосимптомности течения ХГС. Пациенты часто обращаются для углубленного обследования и выбора схемы терапии в стационар после случайного обнаружения антител к HCV-инфекции во время различных скрининговых исследований.

Определение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаргатаминотрансферазы (АсАТ) показало диапазон колебаний АлАТ от 17 до 359 Ед./л, а АсАТ – от 21 до 379 Ед./л. Медиана АлАТ составила $75,16 \pm 55,4$ Ед./л, медиана АсАТ – $51 \pm 40,08$ Ед./л. Только у 14 (11,4%) пациентов определялись неизмененные показатели АлАТ и у 29,3% – АсАТ. У 109 (88,6%) пациентов была повышена активность АлАТ. Увеличение уровня этого фермента в два раза наблюдалось у 29 (23,6%) пациентов, в три раза - у 16 (13%), в четыре раза и более - у 9 (7,3%).

Повышение активности АлАТ и АсАТ является маркером цитолитического синдрома, который свидетельствуют о наличии патологического процесса в

печени. У подавляющего большинства пациентов данной выборки ХГС протекал с умеренно выраженным цитолизом.

В ряде случаев было обнаружено увеличение концентрации билирубина: у 16 пациентов (13%) наблюдалось незначительное повышение от 20,5 до 30,0 мкмоль/л и лишь у четырех (3,31%) – повышение варьировалось от 30,5 до 50,46 мкмоль/л – и во всех четырех случаях сопровождалось субъиктеричностью или краевой желтушностью склер. Отсутствие повышенных значений билирубина обнаруживалось у 103 пациентов (83,7%). Медианные значения общего билирубина составили $14,2 \pm 7,6$ мкмоль/л.

Показатели ГГТП были повышены у 92 пациентов (74,8%), медиана показателя составила $57 \pm 47,08$ ммоль/л. Соотношение мужчин и женщин с повышением данного показателя было одинаковым 1:1 (37,4%).

Уровень щелочной фосфатазы был выше предельно допустимой нормы у 23 пациентов (18,7%). Медиана данного показателя составила $78 \pm 42,5$ Ед./л при максимальном значении – 305 Ед./л. Из всех женщин только у 10 (16,7%) определялась повышенная активность щелочной фосфатазы, а среди мужчин – у 13 (20,6%).

Содержание глюкозы крови определялось выше нормы у 15 пациентов (12,2%). Только у 4 из них в анамнезе были указания на сахарный диабет и у 4 – на ожирение, остальные не были обследованы у эндокринолога. Медиана содержания глюкозы крови составила $4,83 \pm 1,12$ г/л.

Протромбиновый индекс у 23 пациентов (18,7%) из 123 был ниже нормальных показателей. Однако снижение ПТИ было умеренным, и значение данного показателя варьировалось от 60 до 79%. Медианное значение ПТИ у всех пациентов составило $91,63 \pm 12,82\%$.

В процессе исследования только 39 пациентам из 123 были определены уровни общего белка крови и альбуминов. У 3 человек (7,7%) было обнаружено снижение содержания общего белка и у одного (2,6%) – снижение содержания альбумина крови. Медиана содержания общего белка составила $72,7 \pm 8,25$ г/л, а

медиана содержания альбумина крови составила $55,075 \pm 19,055$ г/л, что является вариантом нормы.

Среди биохимических показателей у исследуемых пациентов определялись следующие корреляционные зависимости. Уровень содержания глюкозы крови имел прямую положительную корреляционную связь с возрастом пациентов ($r=0,2$; $p<0,05$).

Данный факт объясняется увеличением количества пациентов с сахарным диабетом с увеличением возраста.

Концентрация в крови общего билирубина коррелировала с уровнем АЛТ ($r=0,279$; $p<0,05$) и с уровнем АСТ ($r=0,305$; $p<0,01$). Также наблюдалась прямая корреляционная связь с ГГТП ($r=0,2$; $p<0,05$).

Полученные данные говорят о том, что у пациентов с ХГС имеются одновременно лабораторные проявления двух патогенетических синдромов поражения печени: экскреторно-билиарного и цитолитического.

Повышение в крови пациентов активности АЛТ связано прямой корреляционной зависимостью с повышением активности АСТ ($r=0,788$; $p<0,0001$).

Данная корреляционная связь объясняется тем, что увеличение активности ферментов в крови пациентов с ХГС является лабораторным маркером цитолитического синдрома.

Также наблюдается корреляционная связь между содержанием ферментов ГГТП и щелочной фосфатазы ($r=0,436$; $p<0,001$).

Показатели гемоглобина были ниже нормальных значений у 9 больных (7,3%), у остальных 114 человек (92,7%) наблюдались нормальные значения данного показателя. Медиана гемоглобина была $139,1 \pm 26,7$ Ед./л. Уровень тромбоцитов лишь у 25 пациентов (20,3%) оказался сниженными. Медиана содержания тромбоцитов составила $202,0 \pm 88,5$. Также оказалось, что у 12 пациентов (9,8%) наблюдался умеренный лейкоцитоз от $9,2$ до $15 \cdot 10^9$ в литре, а у 7 пациентов (5,7%) – лейкопения с показателями содержания лейкоцитов от $2,8$ до $3,9 \cdot 10^9$ в литре. Медиана содержания лейкоцитов составила $5,89 \pm 2,015 \cdot 10^9$ в

литре. У 6 больных (4,9%) был обнаружен лимфоцитоз и лишь у одного (0,81%) - лимфопения. Медианное значение содержания лимфоцитов было в пределах нормальных значений и составило $1,90 \pm 0,85 \cdot 10^9$ в литре. Показатель скорости оседания эритроцитов (СОЭ) у 45 пациентов (36,6%) превышал норму. Медиана СОЭ составила 12 ± 11 мм в час.

Таким образом, оказалось, что наиболее часто встречающимся изменением в клиническом анализе крови была тромбоцитопения и анемия, а также лейкоцитоз.

Обнаруживалась положительная корреляционная связь между содержанием лейкоцитов в крови и СОЭ у пациентов ($r=0,22$; $p<0,05$). Также связь между СОЭ и уровнем глюкозы крови имела положительное значение ($r=0,26$; $p<0,05$). Других статистически достоверных зависимостей между лабораторными показателями выявлено не было.

Полученные результаты говорят о минимальной биохимической активности процесса у пациентов с ХГС. Ведущими патогенетическими процессами при ХГС у пациентов данного исследования являются цитолитический и экскреторно-биллярный.

У всех пациентов (100%) проводили определение генотипа ВГС. Анализ исследования генотипов показал преобладание 1 генотипа вируса (1a генотип выявлялся у 4 пациентов (3,3%), 1b генотип встречался у 93 человек (75,6%)) над 3 и 2 генотипами (3a генотип определялся у 20 человек (16,3%), 2 генотип был отмечен у 5 больных (4%)). У одного пациента была обнаружена микст-инфекция 1b+1a генотип.

Результат данного исследования свидетельствует о том, что наиболее часто выявляемыми генотипами являются генотипы 1b и 3a, что соответствует официальным литературным данным о распределении генотипов ВГС на территории РФ.

Также у всех больных (100%) была определена ВН. Высокий уровень ВН (содержание РНК ВГС в крови > 800000 МЕ/мл) определен у 58 пациентов (47%). Средний уровень ВН (содержание РНК в крови от 400000 до 800000 МЕ/мл) был

обнаружен у 27 больных (22%). Низкий уровень ВН (содержание РНК в крови < 400000 МЕ/мл) выявлялся у 38 человек (31%). Вирусная нагрузка у пациентов с различными генотипами ВГС приведена на рисунке 1.

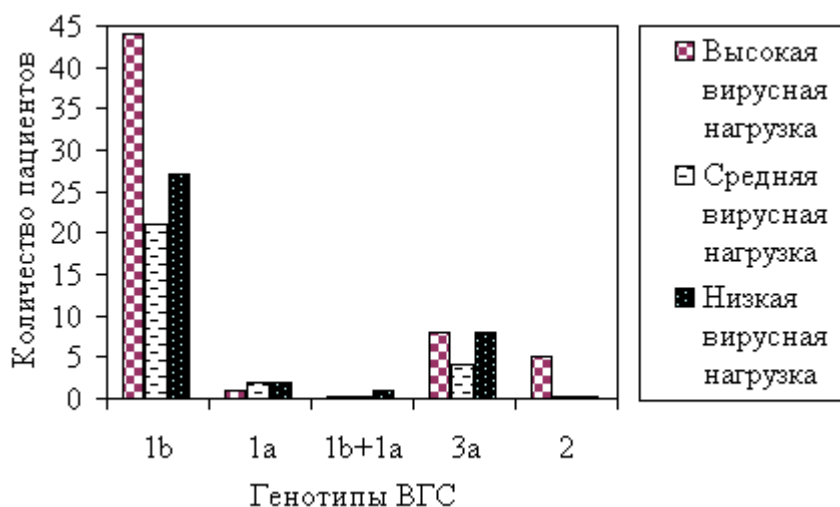


Рисунок 1 – Распределение ВН по генотипам ВГС у обследованных пациентов

3.2 Характеристика иммунологических показателей

У 86 пациентов было проведено определение содержания цитокинов IFN γ и TNF α и хемокинов CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL11/ITAC в плазме крови методом мультиплексного анализа. Такое же исследование было проведено в группе условно здоровых лиц (26 человек).

В результате проведенного статистического сравнения медианных значений данных показателей у условно здоровых лиц и пациентов с ХГС оказалось, что содержание TNF α у пациентов с ХГС было в 1,9 раза выше, чем в группе условно здоровых лиц ($p < 0,001$).

Также наблюдались значительные различия концентраций хемокинов CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL11/ITAC у пациентов с ХГС и у контрольной группы. Медианные значения концентрации хемокинов CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG и CXCL11/ITAC у пациентов с ХГС превышали значения группы условно здоровых лиц в 1,6 раза ($p = 0,0002$), 3,2 раза ($p < 0,001$) и 2,8 раза ($p < 0,001$) соответственно.

Результаты сравнения концентраций цитокинов и хемокинов у пациентов с ХГС и условно здоровых лиц приведены в таблице 2. В ней показаны медиана (Me), нижний и верхний квартили (Q1, Q3) и достоверности различий двух выборок с использованием теста Манна – Уитни (p (M-W)).

Таблица 2 – Сравнительная характеристика концентраций цитокинов и хемокинов в плазме периферической крови у пациентов с ХГС и условно здоровых лиц

Цитокин/ Хемокин	Концентрация в плазме крови, пг/мл				p (M-W)
	Условно здоровые лица		ХГС		
	Me	Q1 – Q3	Me	Q1 – Q3	
IFNγ	4,1 (n=51)	3,2-9,8	3,2 (n=86)	2,4-7,2	0,26
TNFα	6,5 (n=51)	5,3-7,8	12,4 (n=86)	8,-17,0	1,9·10 ⁻⁷
CCL20/MIP-3α	13,0 (n=37)	9,8-16,4	21,1 (n=84)	13,-35,0	0,0002
CXCL9/MIG	444,10 (n=37)	342,7-851,6	1406,6 (n=84)	746,8-2765,3	8,43·10 ⁻⁷
CXCL11/ITAC	77,5 (n=37)	57,7-123,5	217,6 (n=84)	126,9-460,7	7,53·10 ⁻⁹

Таким образом, повышение в периферической крови пациентов с ХГС содержания TNF α , CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG и CXCL11/ITAC в несколько раз (от 1,6 до 3,2 раза) в сравнении с данными показателями в группе условно здоровых лиц свидетельствует об их важной роли в процессе эрадикации ВГС из гепатоцитов посредством активации Т-клеточного звена иммунитета.

Далее был проведен корреляционный анализ содержания цитокинов/хемокинов у пациентов с ХГС. Обнаруженные корреляционные связи представлены в таблице 3. Более сильная корреляционная связь была обнаружена между концентрацией TNF α и CXCL9/MIG ($r=0,397$; $p<0,01$) и CXCL11/ITAC ($r=0,491$; $p<0,001$), а также между CXCL9/MIG и CXCL11/ITAC ($r=0,515$; $p<0,001$) и CCL20/MIP-3 α и CXCL11/ITAC ($r=0,431$; $p<0,005$).

Анализ выявил слабую прямую корреляцию между $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ ($r=0,278$; $p<0,005$), $CCL20/MIP-3\alpha$ ($r=0,272$; $p<0,005$), а также между $CCL20/MIP-3\alpha$ и $CXCL9/MIG$ ($r=0,218$; $p<0,005$).

Таблица 3 – Анализ корреляционной связи содержания цитокинов и хемокинов в плазме крови больных ХГС

Цитокины/хемокины		$IFN\gamma$	$TNF\alpha$	$CCL20/MIP-3\alpha$	$CXCL9/MIG$	$CXCL11/ITAC$
$IFN\gamma$	r		0,278	0,272	-0,008	0,136
	p		0,010	0,012	0,942	0,218
$TNF\alpha$	r	0,278		0,264	0,397	0,491
	p	0,010		0,015	0,0002	$2,17 \cdot 10^{-6}$
$CCL20/MIP-3\alpha$	r	0,272	0,264		0,218	0,431
	p	0,012	0,015		0,046	0,00004
$CXCL9/MIG$	r	-0,008	0,397	0,218		0,515
	p	0,942	0,0002	0,046		$5,5 \cdot 10^{-7}$
$CXCL11/ITAC$	r	0,136	0,491	0,431	0,515	
	p	0,218	$2,17 \cdot 10^{-6}$	0,00004	$5,5 \cdot 10^{-7}$	

Примечание: В таблице указаны коэффициенты корреляции Спирмена (r) и критерий достоверности (p).

На следующем этапе нами был проведен корреляционный анализ между хемокинами и клинико-лабораторными показателями.

Были обнаружены слабые корреляционные связи между содержанием хемокина $CXCL9/MIG$ и возрастом пациентов ($r=0,282$; $p<0,05$), а также между содержанием хемокина $CCL20/MIP-3\alpha$ и степенью увеличения размеров печени ($r=0,221$; $p<0,05$.)

Возможно, это было связано с длительностью течения инфекционного процесса: чем старше пациенты, тем больше срок инфицирования и тем больше степень увеличения печени, обнаруживаемая при объективном обследовании.

Корреляционный анализ содержания цитокинов/хемокинов и биохимических показателей выявил слабую отрицательную корреляционную связь между уровнями ГГТП и $IFN\gamma$ ($r=0,228$; $p<0,05$).

Также обнаружили отрицательные корреляционные связи при изучении показателей клинического анализа крови. Увеличение в крови больных концентрации $IFN\gamma$ сопровождалось уменьшением содержания тромбоцитов ($r = -0,274$; $p < 0,05$), и увеличение концентрации $TNF\alpha$ сопровождалось уменьшением содержания тромбоцитов ($r = -0,313$; $p < 0,05$).

Данные иммунологические показатели являются маркерами хронического воспалительного процесса, а, чем дольше срок инфицирования ХГС у пациентов, тем чаще обнаруживается повышение $TNF\alpha$ и $IFN\gamma$, тем чаще возникает аутоиммунная реакция по отношению к тромбоцитам с измененными рецепторами и их содержание в крови уменьшается.

Было обнаружено одновременное увеличение $TNF\alpha$ и абсолютного содержания нейтрофильных лейкоцитов в крови пациентов с ХГС ($r = 0,22$; $p < 0,05$).

Скорее всего, этот факт связан с обострением у данных пациентов сопутствующих хронических бактериальных инфекций, при которых и активируются иммунологические маркеры воспаления, и возникает нейтрофильный сдвиг лейкоцитарной формулы влево.

В результате анализа не было обнаружено корреляций между уровнем вирусной нагрузки и содержанием цитокинов/хемокинов в плазме крови, а также между уровнем вирусной нагрузки и стадией фиброза печени.

Содержание основных популяций лимфоцитов в крови больных ХГС и условно здоровых лиц было определено методом проточной цитометрии. Было исследовано содержание Т-клеток (Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов), В-лимфоцитов, NK-клеток, NKT-клеток, в том числе экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3.

При сравнении периферической крови пациентов с ХГС и условно здоровых лиц не было выявлено статистически значимых различий в процентном содержании Т-лимфоцитов.

Среди Т-клеток у больных с ХГС в сравнении с условно здоровыми лицами было обнаружено сниженное содержание $CD45+CD3+CD4+$ Т-хелперов. У

пациентов с ХГС медианные значения составили 44,5% (40-48,1); у условно здоровых лиц – 49,6% (43,6-54,4) с достоверностью $p=0,012$.

Однако содержание цитотоксических CD45+CD3+CD8+ Т-лимфоцитов в группе пациентов с ХГС оказалось значительно больше, чем у условно здоровых лиц. Медианное значение у пациентов с ХГС составляло 70,3% (30-78), а в контрольной группе – 22,9% (18,4-27,1), достоверность различия $p<0,001$.

Сниженное содержание Т-хелперов у пациентов с ХГС, возможно, свидетельствует об иммунорегулирующей роли ВГС в угнетении Т-хелперов. Активация CTL происходит в ответ на репликацию вируса в гепатоцитах.

Также было обнаружено снижение процентного содержания В-лимфоцитов у пациентов с ХГС в сравнении с условно здоровыми лицами ($p=0,046$). Медиана содержания В-клеток у больных ХГС составила 10% (7-13,1), а у условно здоровых лиц – 12,9% (8,5-15,6).

Выраженные различия были обнаружены между содержанием НК-клеток у больных ХГС и контрольной группой. Медианное значение у больных ХГС составило 10,6% (7,7-14,7) и было достоверно выше, чем у условно здоровых лиц ($Me=6,82\%$; $p<0,001$). Также были выявлены меньшие значения содержания НКТ-клеток у пациентов с ХГС ($Me=2,6\%$ (1,2-4,8)) в отличие от условно здоровых лиц. ($Me=5,46\%$ (1,8-8,1)).

Таким образом, перераспределение основных субпопуляций лимфоцитов у пациентов с ХГС возникло за счет увеличения процентного содержания CTL и НК-клеток как результат ответной реакции организма на репликацию ВГС в гепатоцитах.

Анализ результатов определения количества субпопуляций лимфоцитов, несущих на своей поверхности CCR6 и CXCR3, в крови пациентов с ХГС и условно здоровых лиц показал, что содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3, у пациентов ХГС достоверно не отличалось от содержания в группе условно здоровых лиц. При этом обнаруживалось снижение уровня Th, CTL, НК-клеток и НКТ-клеток, экспрессирующих на своей поверхности CXCR3. Так, содержание Th-лимфоцитов с CXCR3 у пациентов с ХГС было в 1,3 раза меньше

($p=0,003$), чем у условно здоровых лиц. Процентное содержание CTL с CXCR3 оказалось в 1,6 раза меньше ($p<0,001$), чем у контрольной группы, и содержание НК-клеток было в 3,4 раза меньше ($p<0,001$), а NKT-клеток в 2,7 раза меньше ($p<0,001$), чем в контрольной группе.

Таблица 4 – Характеристика субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3, в крови пациентов с ХГС и условно здоровых лиц

Субпопуляции клеток		Количество клеток				p(M-W)
		Контроль (n=23)		Пациенты с ХГС (n=67)		
		Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
В-лимфоциты	%	12,9	8,5-15,6	10,0	7,0-13,1	0,046
	×10 ⁶ /л	0,2	0,21-0,25	0,18	0,12-0,25	0,05
CXCR3+В-лимфоциты	%	4,5	2,6-8,3	18,1	10,1-24,6	4,3·10 ⁻⁸
	×10 ⁶ /л	0,6	0,32-0,93	3,99	2,29-7,15	4,25·10 ⁻⁷
Т-лимфоциты	%	79,4	73,7-83,5	76,5	71,1-81,5	0,13
	×10 ⁶ /л	1143,0	984,0-1419,0	1453,0	1057,0-2034,0	0,07
CXCR3+Т-лимфоциты	%	39,0	33,0-44,3	42,3	35,5-48,1	0,67
	×10 ⁶ /л	440,0	397,0-607,0	688,0	481,0-1220,0	0,005
Т-хелперы	%	49,6	43,6-54,4	44,5	40,0-48,6	0,01
	×10 ⁶ /л	707,0	575,0-916,0	831,0	670,0-1219,0	0,1
CXCR3+Т-хелперы	%	41,2	32,3-50,2	31,4	264-37,2	0,003
	×10 ⁶ /л	226,0	189,0-321,0	630,0	330,0-813,0	4·10 ⁻⁷
CCR6+Т-хелперы	%	69,1	63,6-73,7	33,5	24,3-57,9	5,04·10 ⁻⁸
	×10 ⁶ /л	487,0	376,0-675,0	388,0	258,0-558,0	0,15
CTL	%	22,9	18,4-27,1	70,3	30,0-78,0	7,15·10 ⁻⁷
	×10 ⁶ /л	348,0	264,0-413,0	1418,0	1048,0-1995,0	2,31·10 ⁻¹⁰
CXCR3+CTL	%	66,6	59,7-75,5	43,1	30,5-61,6	7,97·10 ⁻⁷
	×10 ⁶ /л	212,0	186,0-283,0	697,0	450,0-1039,0	1,32·10 ⁻⁸
CCR6+CTL	%	11,3	6,1-21,4	7,7	5,2-13,2	0,05
	×10 ⁶ /л	35,0	22,0-91,0	154,0	87,0-221,0	2,7·10 ⁻⁶
NK-клетки	%	6,8	3,9-11,5	10,6	7,7-14,7	0,001
	×10 ⁶ /л	104,0	71,0-166,0	163,0	119,0-241,0	0,005
CXCR3+NK-клетки	%	38,9	31,5-60,1	11,4	7,4-21,5	3,16·10 ⁻⁸
	×10 ⁶ /л	45,0	26,0-69,0	32,0	15,0-63,0	0,18
CCR6+NK-клетки	%	5,7	0,9-7,7	3,0	1,8-5,5	0,16
	×10 ⁶ /л	4,1	1,35-10,8	5,86	2,32-10,6	0,36
NKT-клетки	%	5,5	1,8-8,1	2,6	1,2-4,8	0,015
	×10 ⁶ /л	65,0	32,0-140,0	34,0	14,7-80,0	0,04
CXCR3+NKT-клетки	%	49,8	39,2-64,6	22,0	15,0-45,0	0,0002
	×10 ⁶ /л	33,3	19,6-60,6	12,1	6,26-28,2	0,002
CCR6+NKT-клетки	%	55,7	41,5-62,3	18,3	9,5-48,0	0,00005
	×10 ⁶ /л	33,0	13,3-65,5	8,81	3,87-31,5	0,004

В-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3, у пациентов с ХГС было в 4 раза больше ($p < 0,001$), чем в группе условно здоровых лиц.

Относительное содержание Th-лимфоцитов, CTL, NKT-клетки, экспрессирующих на своей поверхности CCR6 хемокиновый рецептор, было значительно меньше, чем в контрольной группе: Th в 2 раза ($p < 0,001$), CTL в 1,5 раза ($p = 0,052$) и NKT-клеток в 3 раза ($p < 0,001$).

Таким образом, в группе пациентов с ХГС происходит угнетение субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6 хемокиновые рецепторы, что является результатом взаимодействия ВГС и гепатоцита, в результате которого ВГС подавляет клеточное цитотоксическое звено иммунитета. Увеличение В-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 рецептор указывает на активацию гуморального звена иммунитета у пациентов с ХГС. Данные по медианам (Me), интерквартильному размаху (Q1-Q3) и результаты сравнения методом Манна-Уитни (достоверность p (M-W)) представлены в таблице 4.

3.3 Характеристика иммунологических показателей пациентов с учетом стадии заболевания

Чаще всего у обследованных пациентов было обнаружено отсутствие фиброза печени (F0) – 45 человек (36,6%), первая стадия фиброза печени (F1) была определена у 27 пациентов (22%), вторая стадия выявлялась (F2) у 23 больных (18,7%), третья стадия (F3) – у 11 человек (8,9%) и у 17 (13,8%) – четвертая стадия фиброза печени (F4).

Таким образом, у подавляющего большинства пациентов (около 58%) либо отсутствовали фибротические изменения в печени, либо имели место начальные проявления (F1). Степень выраженности фибротических изменений в печени коррелировала с возрастом пациентов ($r = 0,263$; $p < 0,05$), с размерами печени ($r = 0,587$; $p < 0,0001$) и селезенки ($r = 0,2$; $p < 0,05$).

Выявлена корреляционная зависимость между степенью активности трансаминаз (АлАТ и АсАТ) и степенью выраженностью фиброза печени. Обнаружена положительная корреляция между стадией фиброза печени и АлАТ ($r=0,237$; $p<0,05$), АсАТ ($r=0,325$; $p<0,05$), а также с уровнем глюкозы крови ($r=0,2$; $p<0,05$). В то же время корреляция между стадией фиброза печени и количеством тромбоцитов в крови обследованных пациентов оказалась отрицательной ($r = - 0,371$; $p<0,001$).

Для проведения анализа результатов иммунологического исследования в зависимости от стадии заболевания были выделены три группы пациентов:

- первая группа – пациенты без фиброза печени или с умеренно выраженным фиброзом F0-1,
- вторая группа – пациенты с выраженным фиброзом печени (F2),
- третья группа – пациенты с резко выраженным фиброзом или циррозом печени F3-4.

У пациентов при всех стадиях фиброза печени статистически значимо увеличивались концентрации $TNF\alpha$, CCL20/MIP-3 α лиганда CCR6 рецептора и двух лигандов CXCR3 рецептора (CXCL9/MIG и CXCL11/ITAC) по сравнению с группой условно здоровых лиц. В таблице 5 представлены данные по медианам (Me), нижним и верхним квартилям (Q1, Q3) концентраций цитокинов/хемокинов. Достоверность различий между группами больных ХГС и условно здоровых лиц проводились с помощью теста Манна-Уитни (достоверность p).

Наибольшее различие медиан, перечисленных выше циткинов/хемокинов, наблюдалось в группе с максимально выраженным фиброзом (F3-4): $TNF\alpha$ в 2,2 раза, CXCL9/MIG в 4,8 раза и CXCL11/ITAC в 3,1 раза превышали медианы этих показателей в группе здоровых лиц. Зависимость содержания цитокинов/хемокинов пациентов с ХГС от степеней фиброза представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Содержание цитокинов/хемокинов в плазме крови условно здоровых лиц и пациентов с ХГС в зависимости от стадии фиброза

Цитокины/ Хемокины	Концентрация в плазме крови, пг/мл							
	Контроль		F0-1		F2		F3-4	
	Me	Q1-Q3	Me (p)	Q1-Q3	Me (p)	Q1-Q3	Me (p)	Q1-Q3
IFN γ	4,90	2,75-9,25	3,2 (0,03)	2,508-11,12	3,19 (0,001)	1,979-6,573	4,37 (0,07)	1,76- 6,968
TNF α	6,76	6,04-8,34	10,7 (0,0005)	6,513-17,25	12,27 (0,0002)	6,917-15,57	15 (9,2·10 ⁻⁹)	11,32- 19,06
CCL20/ MIP-3 α	13,0	9,76-16,1	18,4 (0,02)	11,37-33,35	20,03 (0,005)	12,83- 30,15	31,97 0,00002	15,56- 35,65
CXCL9/ MIG	444,1	344,3-811,5	1132,0 (0,0003)	562,2- 2509,0	1182,0 (0,0005)	680,8- 1931,0	2121 (2,3·10 ⁻⁶)	990,1; 4609
CXCL11/ ITAC	77,49	57,7-122,2	208,6 (7,3·10 ⁻⁷)	127,6-402,7	196,6 (0,0004)	84,1- 509,4	242,8 (8,8·10 ⁻⁷)	127,6; 437,8

Результаты анализа корреляции концентрации цитокинов/хемокинов и стадии фиброза печени приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Корреляционный анализ содержания цитокинов и хемокинов в плазме крови и стадией фиброза печени

Цитокин/хемокин	Коэффициент корреляции Спирмена (r)	Критерий достоверности (p)
CXCL9/MIG	0,253	0,020
CXCL11/ITAC	0,077	0,485
CCL20/MIP-3 α	0,206	0,060
IFN γ	-0,019	0,860
TNF α	0,207	0,056

В результате было установлено наличие слабой прямой корреляции между содержанием хемокина CXCL9/MIG и стадией фиброза печени ($r=0,253$; $p=0,02$). Эта корреляционная зависимость отображена на рисунке 2.

Таким образом, установленная корреляционная зависимость между хемокином CXCL9/MIG в плазме крови пациентов с ХГС и степенью фибротических изменений в печени свидетельствует о его значимости в иммунопатогенезе ХГС и в частности в процессах фиброгенеза печени.

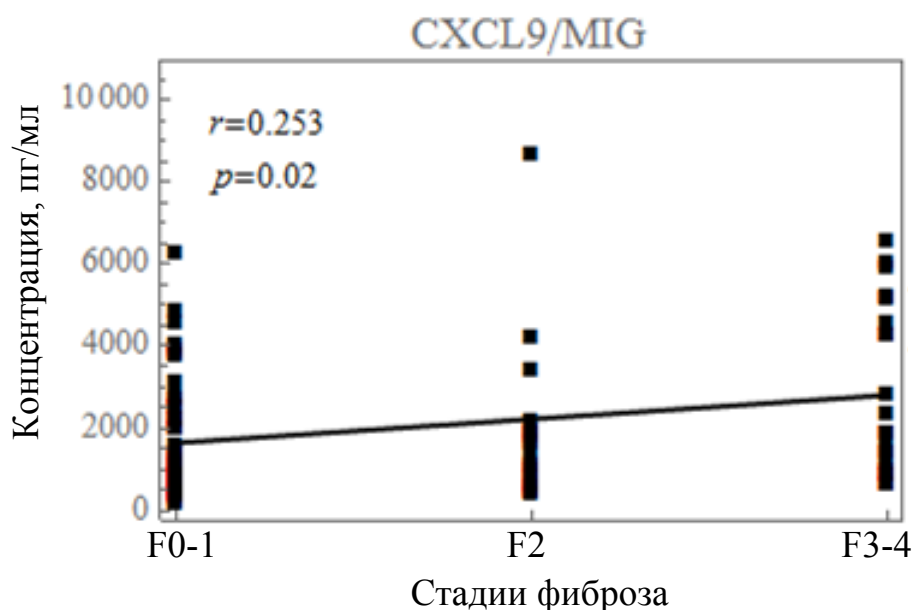


Рисунок 2 – Корреляционная зависимость содержания CXCL9/MIG в плазме крови от стадии фиброза печени

В таблице 7 приведены данные по содержанию субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, у пациентов с ХГС с различными стадиями фиброза печени и условно здоровых лиц. В ней приведены медианы (Me), нижний и верхний квартили (Q1, Q3). Для сравнения нескольких выборок был применен тест Краскела-Уоллиса (достоверность p (KW)), для сравнения двух выборок – тест Манна – Уитни (достоверность p).

В результате сравнения относительного содержания разных субпопуляций лимфоцитов оказалось, что достоверно отличается только % CCR6+ NK ($p=0,0039$). У пациентов с различной стадией фиброза печени обнаружено достоверное различие ($p<0.05$) абсолютных значений CCR6+ Th, CXCR3+ CTL, CXCR3+ NK, CXCR3+ NKT, CCR6+ NKT-клеток. Причем медианы содержания этих клеток оказались ниже по сравнению с контрольной группой, что связано действием ВГС, который подавляет активность клеток, обладающих цитотоксическим действием по отношению к пораженным вирусом гепатоцитам. Достоверное повышение абсолютного значения CXCR3+ В-лимфоцитов свидетельствует об активации гуморального звена иммунитета.

Таблица 7 – Содержание популяций лимфоцитов в том числе, экспрессирующих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3, в периферической крови условно здоровых лиц и пациентов с ХГС с различными стадиями фиброза печени

Субпопуляции лимфоцитов		Контроль		F0-1		F2		F3-4		p(KW)
		Me	Q1-Q3	Me (p)	Q1-Q3	Me (p)	Q1-Q3	Me (p)	Q1-Q3	
Т-лимфоциты	%	79,4	74,2-83,2	76,7 (0,1)	73,0-79,7	78,3(0,3)	73,6-81,3	74,8 (0,2)	68,7-82,0	0,9
	×10 ⁶ /л	1143,1	978,7-1423,7	1605,0(0,01)	1254,0-1943,0	1314,0(0,001)	1052,0-1655,0	1413,0 (0,01)	869-1993	0,7
CXCR3+ Т-лимфоциты	%	39,0	33,5-44,3	38,1(0,6)	31,1-46,0	43,5(0,1)	38,-51,5	41,8 (0,7)	20,7-45,0	0,2
	×10 ⁶ /л	439,9	395,2-608,7	563,0(0,1)	471,0-773,0	633,0(0,06)	474,0-831,0	571,0 (0,5)	385-656	0,9
Т-хелперы	%	49,6	44,0-54,2	42,3(0,02)	36,0-47,8	43,6(0,08)	40,0-50,3	41,6 (0,03)	36,6-47,3	0,6
	×10 ⁶ /л	707,1	566,2-927,9	819,0(0,1)	667,0-1126,0	730,0(0,5)	631,0-1177,0	719,0 (0,7)	611-1388	0,6
CXCR3+ Т-хелперы	%	31,4	26,7-37,2	38,4(0,3)	27,0-43,7	43,2(0,07)	28,7-49,5	39,8 (0,1)	31,0-48,9	0,6
	×10 ⁶ /л	226,2	184,7-328,5	287,0(0,07)	233,0-416,0	299,0(0,06)	203,0-441,0	321,0 (0,2)	248-384	0,9
CCR6+ Т-хелперы	%	69,1	63,8-73,4	25,8(0,01)	19,2-33,6	32,3(0,001)	25,2-41,4	26,7 (0,01)	21,1-31,6	0,1
	×10 ⁶ /л	486,7	370,8-704,1	211,0(0,01)	158,0-311,0	227,0(0,001)	191,0-337,0	222,0 (0,01)	129-310	0,8
CTL	%	23,0	18,8-27,1	26,5(0,08)	21,6-35,4	23,8(0,7)	18,8-29,9	29,1 (0,4)	18,8-31,7	0,6
	×10 ⁶ /л	348,3	262,3-419,6	562,0(0,002)	403,0-819,0	386,0(0,1)	318,0-510,0	578,0 (0,05)	390-617	0,3
CXCR3+CTL	%	66,6	59,8-75,5	35,4(0,01)	26,9-43,2	34,8(0,001)	31,4-41,8	29,1 (0,01)	26,6-49,2	0,9
	×10 ⁶ /л	212,1	185,5-289,9	188,0(0,4)	129,0-306,0	154,0(0,05)	108,0-246,0	178,0 (0,2)	115-246	0,5
CCR6+ CTL	%	11,3	6,1-19,8	7,5(0,06)	5,0-11,0	7,7(0,03)	4,4-10,5	5,2 (0,002)	2,58-5,93	0,1
	×10 ⁶ /л	35,1	20,9-91,4	40,0(0,7)	25,0-65,0	30,0(0,5)	20,0-38,0	18,0 (0,04)	12-31	0,02

Продолжение таблицы 7

Субпопуляции лимфоцитов		Контроль		F0-1		F2		F3-4		p(KW)
		Me	Q1-Q3	Me (p)	Q1-Q3	Me (p)	Q1-Q3	Me (p)	Q1-Q3	
В-лимфоциты	%	12,9	8,6-15,1	9,1(0,03)	6,2-11,5	10,3(0,2)	8,8-11,8	10,3 (0,5)	7,75-14,9	0,3
	×10 ⁶ /л	231,0	208,0-254,0	193,0(0,09)	122,0-246,0	208,0(0,3)	138,0-264,0	165,0 (0,4)	95-355	0,9
CXCR3+ В-лимфоциты	%	4,5	2,7-7,7	15,5(0,01)	10,9-24,6	20,6(0,001)	13,5-26,9	10,0 (0,005)	5,8-21,9	0,9
	×10 ⁶ /л	6,0	3,1-9,2	34,0(0,01)	17,0-45,0	38,0(0,001)	18,0-56,0	28,0 (0,01)	15-43	0,7
NK-клетки	%	6,8	4,0-11,1	11,9(0,01)	8,5-16,2	9,6(0,02)	8,2-18,4	10,6 (0,01)	8,7-16,4	0,9
	×10 ⁶ /л	103,6	69,4-168,1	213,0(0,01)	137,0-397,0	217,0(0,003)	132,0-313,0	210,0 (0,02)	120-354	0,9
CXCR3+ NK-клетки	%	38,9	32,2-58,9	7,4(0,01)	4,6-10,6	11,2(0,001)	7,5-14,4	9,2 (0,01)	4,38-14,3	0,2
	×10 ⁶ /л	44,6	25,9-69,3	15,0(0,01)	9,0-23,0	19,0(0,002)	14,0-32,0	9,0 (0,01)	7-47	0,5
CCR6+ NK-клетки	%	5,7	0,9-7,7	2,7(0,04)	2,2-3,1	4,5(0,8)	3,1-6,1	2,4 (0,03)	0,7-3,08	0,004
	×10 ⁶ /л	4,1	0,8-10,9	7,0(0,2)	3,9-9,3	9,8(0,03)	5,4-14,0	4,0 (0,7)	4-32	0,006
NKT-клетки	%	5,5	2,1-8,0	2,6(0,04)	1,1-4,7	2,1(0,06)	0,9-6,3	2,8 (0,2)	0,9-7,15	0,9
	×10 ⁶ /л	65,3	29,9-140,9	62,0(0,3)	22,0-102,0	20,0(0,1)	10,0-120,0	34,0 (0,6)	22-149	0,8
CXCR3+ NKT-клетки	%	49,8	39,9-64,0	19,6(0,01)	15,6-26,4	28,0(0,004)	14,3-48,8	14,5 (0,01)	11,7-21,9	0,1
	×10 ⁶ /л	33,3	18,8-62,0	11,0(0,01)	4,0-21,0	5,0(0,006)	2,0-40,0	4,0 (0,01)	2-11	0,4
CCR6+ NKT-клетки	%	55,7	42,8-62,7	14,1(0,01)	9,9-24,1	9,9(0,001)	5,1-17,9	8,5 (0,01)	5,88-14,6	0,1
	×10 ⁶ /л	32,9	12,6-67,2	7,0 (0,01)	4,0-16,0	4,0 (0,001)	0,7-10,6	6,0 (0,01)	1,7-11,1	0,2

ГЛАВА 4 КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПВТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРФЕРОНОВОГО РЕЖИМА ТЕРАПИИ

4.1 Клинико-лабораторная характеристика пациентов во время ПВТ

Этиотропную терапию с использованием интерферонов получил 41 пациент. Соотношение мужчин и женщин было 2,4:1, соответственно 29 мужчин и 12 женщин. Возраст варьировался от 21 до 58 лет, медиана составила $41,8 \pm 16,2$ лет.

15 пациентов ранее не получали этиотропную терапию по поводу ХГС, а 26 человек получали лечение повторно в связи с отсутствием ответа на проводимую ранее терапию или возникшим рецидивом данного заболевания в течение 6 месяцев после окончания терапии.

Перед проведением ПВТ все пациенты проходили скрининговое обследование, которое включало в себя клинический анализ крови, общий анализ мочи, копрограмму, биохимическое исследование крови, определение гормонов щитовидной железы, электролитный баланс крови, ультразвуковое обследование органов брюшной полости, а также проведение эластографии печени для выявления стадии фибротических изменений в ней, проведение молекулярно - биологического и молекулярно - генетического исследования крови пациентов.

Пациенты получали схемы терапии, включающие препараты интерферона. Одна часть (12 пациентов) получала для лечения два препарата – пегилированный интерферон и рибавирин курсом 48 недель. Вторая (29 пациентов) – получала три препарата: пегилированный интерферон, рибавирин и один из ингибиторов NS3/4A сериновой протеазы (нарлапревир, теллапревир, симепревир) – курсом 24 недели.

Все пациенты были инфицированы ВГС 1-го генотипа. Из них 40 были с 1b генотипом, а у 1 пациента было сочетание 1a и 1b генотипов. У пациентов выявлены разные уровни вирусной нагрузки. На старте проводимой терапии

медианное значение уровня ВН у пациентов составило $7,2 \cdot 10^5 \pm 5,0 \cdot 10^5$ МЕ/мл ($2,2 \cdot 10^5$ - $2,4 \cdot 10^6$ МЕ/мл).

В результате ПВТ у 36 пациентов из 41-го был достигнут непосредственный вирусологический ответ (НВО).

У 31 пациента был достигнут быстрый вирусологический ответ (БВО), поскольку через 4 недели терапии в плазме крови отсутствовала РНК ВГС.

Эрадикация вируса гепатита С из периферической крови к 12-й неделе терапии наблюдалась у 5 пациентов, то есть, у них развился ранний вирусологический ответ (РВО).

Тридцать пациентов, достигших БВО в ходе терапии, получали для лечения пегилированный интерферон, рибавирин и один из препаратов прямого противовирусного действия (ПППД). Лишь один пациент получал пегилированный интерферон и рибавирин.

Все пациенты, достигшие РВО, получали лечение двумя препаратами, включая пегилированный интерферон и рибавирин. Эффективность ПВТ представлена на рисунке 3.

Таким образом, к окончанию ПВТ 36 пациентов из 41 развили НВО, что составило 87,8% от всех пролеченных.

Пять пациентов не ответили на проведенную терапию (НО).

Два пациента, не достигших ВО в ходе ПВТ получали одновременно пегилированный интерферон и рибавирин. Данные пациенты получали ранее схему лечения, включающую в себя препарат интерферона короткого действия и рибавирин. После окончания первой попытки ПВТ через 3 и 4 месяца возникал рецидив заболевания.

Пациенты (3 человека), не достигшие вирусологического ответа в ходе лечения, получали одновременно пегилированный интерферон, рибавирин и один из ПППД (нарлапривир или симепревивир). Для данных пациентов попытка терапии была повторной. Ранее они получали терапию с помощью интерферонов короткого действия и рибавирина. Не достигли ВО на предыдущую терапию два пациента, и у одного в течение шести месяцев после лечения развился рецидив.

Один из пациентов, получавших комбинацию препаратов, включающих в себя симепревир, имел микст-инфекцию: 1a + 1b генотипы. Варианты достижения ВО у пациентов с различными комбинациями противовирусных препаратов показаны на рисунке 4.

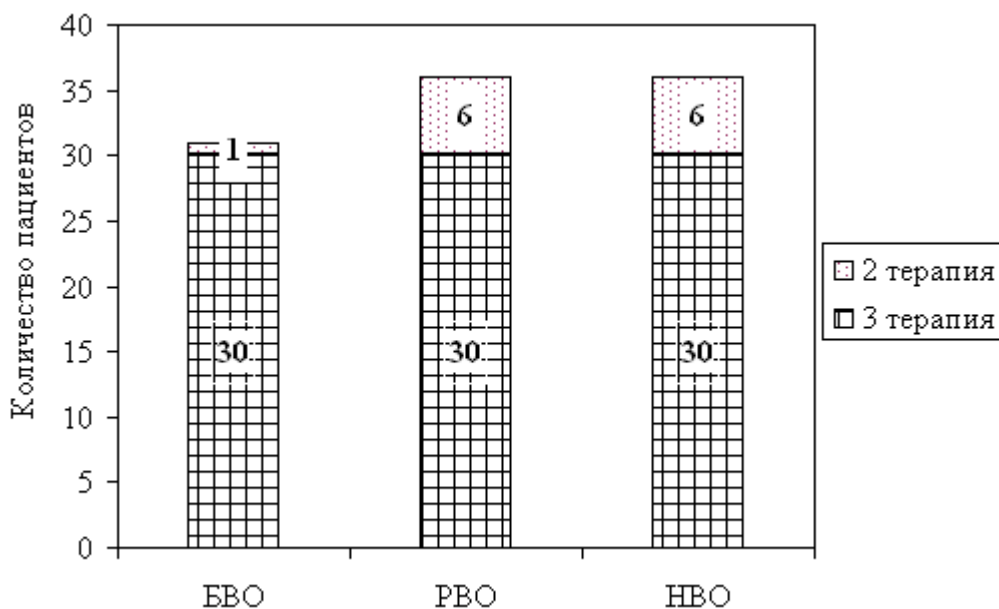


Рисунок 3 – Варианты достижения ВО у пациентов, получивших две разные схемы ПВТ с использованием интерферона

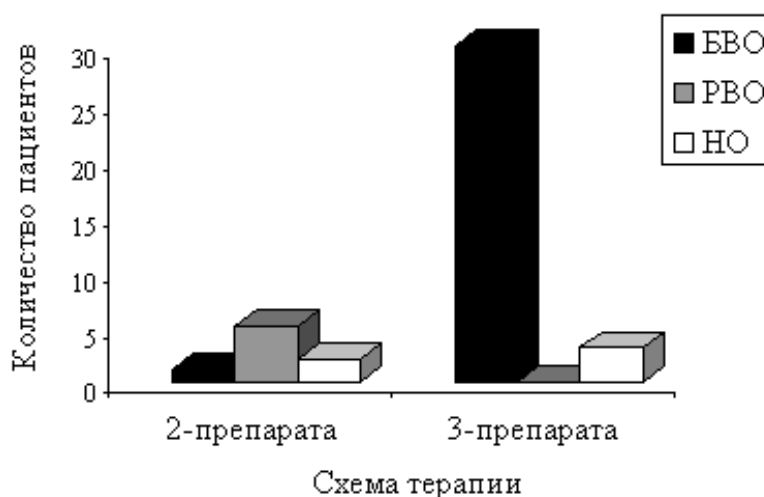


Рисунок 4 – Различные варианты наступления ВО у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа), получавших разные варианты ПВТ

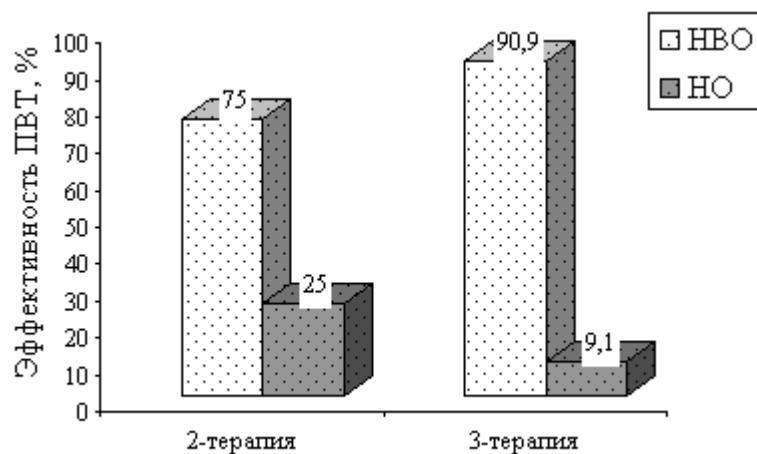


Рисунок 5 – Эффективность различных схем ПВТ с использованием интерферона

Таким образом, достижение НВО при проведении терапии с использованием пегилированного интерферона и рибавирина составило 75%, а при использовании терапии пегилированным интерфероном, рибавирином и одним из препаратов ПППД - 90,1% (рисунок 5).

У пациентов, достигших ВО, негативация ВН в периферической крови произошла к 14 дню от начала терапии, тогда как у не ответивших на лечение пациентов ВН продолжала определяться с колебаниями от умеренной до высокой (рисунок 6).

Внутри группы пациентов, развивших НВО, было обнаружено различие в уровне ВН в зависимости от пола. У мужчин ВН оказалась выше, чем у женщин ($p=0,026$). Возможно, данный факт можно объяснить значительным преобладанием мужчин в выборке или, с другой стороны, наличием у мужчин более часто встречающегося сопутствующего алкогольного поражения печени.

В группе пациентов, развивших вирусологический ответ (36 человек), на старте ПВТ отмечались повышенные значения активности трансаминаз (более 3 ВГН). Медианы значений АлАТ и АсАТ составили 53,3 МЕ/л (42,0 – 78,5 МЕ/л) и 39,04 МЕ/л (32,3 – 53,7 МЕ/л) соответственно. При этом у мужчин чаще обнаруживалась более высокая активность АлАТ, чем у женщин ($p=0,048$). Данный факт указывает на то, что у мужчин чаще встречается сопутствующее токсическое (алкогольное) поражение печени, что ведет к повышению активности трансаминаз. Также у пациентов данной группы была выявлена обратная корреляционная связь между уровнем АлАТ ($r = -0,42$; $p=0,011$) и возрастом. С возрастом у пациентов прогрессируют фибротические изменения в печеночной ткани, что сопровождается уменьшением цитолитической активности.

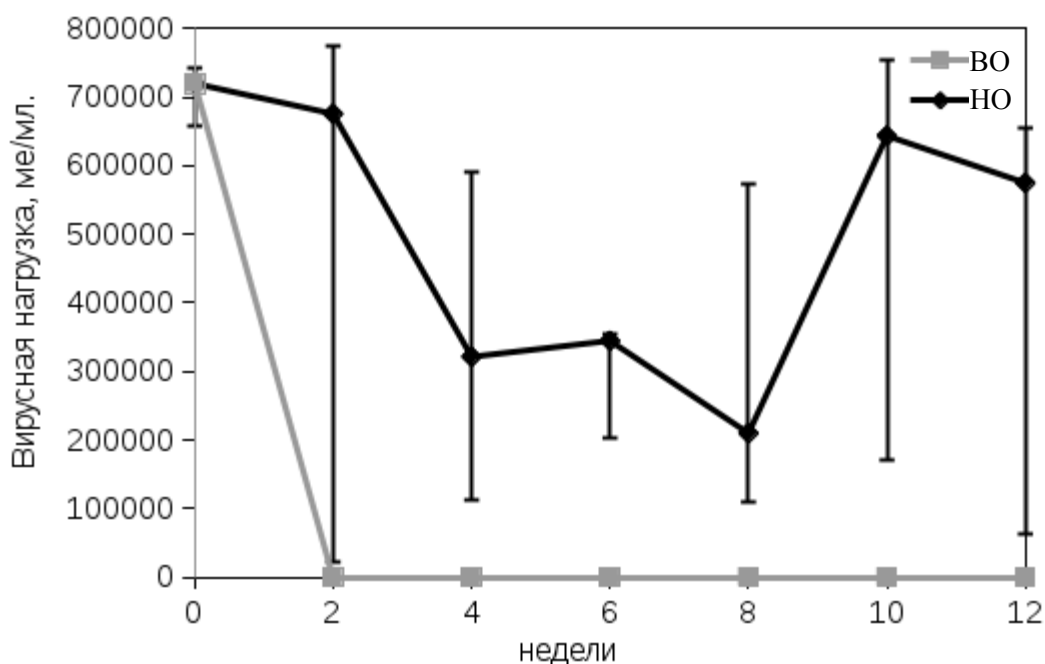


Рисунок 6 – Изменение ВН у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) в ходе ПВТ с использованием интерферонов

Анализ выявил прямую корреляцию между активностью АлАТ и АсАТ ($r=0,85$; $p=0,001$), так как оба фермента высвобождаются из пораженного гепатоцита вследствие цитопатического действия вируса на клетку, а также аутоагрессии со стороны иммунной системы макроорганизма. Содержание билирубина перед ПВТ было в пределах нормальных значений. Корреляционной зависимости между АлАТ и билирубином и АсАТ и билирубином не наблюдалось ($r=0,10$; $p=0,547$ и $r=0,08$; $p=0,632$ соответственно). Медиана уровня билирубина составила 14,65 мкмоль/л (11,225 - 17,05 мкмоль/л).

Вторая группа пациентов, не ответившая на ПВТ, (5 человек) на старте так же, как и выше описанная группа, имела повышенные значения трансаминаз (более 5 ВГН). Медианы АлАТ и АсАТ составили 81 МЕ/л (58 - 143 МЕ/л) и 47 МЕ/л (43 - 67 МЕ/л) соответственно. Показатели билирубина также не превышали нормальных значений. Медиана билирубина составила 19,1 мкмоль/л (12,6 - 21,9 мкмоль/л). У пациентов, не ответивших на терапию, медианные значения активности АлАТ были в 1,5 раза выше, а для АсАТ - в 1,2 раза выше, чем в группе пациентов, достигших ВО.

Повышенная активность фермента ГГТП (более 2 ВГН) наблюдалась у 34,7% мужчин и 46% женщин, достигших вирусологического ответа, перед

началом терапии. Медиана ГГТП в группе пациентов, достигших НВО, составляла 47,5 ЕД/л (32 - 86 МЕ/л). В этой группе была обнаружена отрицательная корреляционная связь между уровнем ГГТП и возрастом пациентов ($r = -0,36$; $p = 0,029$), что свидетельствует о меньшем количестве сопутствующей патологии печени у пациентов более молодого возраста. Положительная корреляционная зависимость обнаружилась между уровнями ГГТП и АлАТ и также ГГТП и АсАТ ($r = 0,55$; $p = 0,004$ и $r = 0,47$; $p = 0,003$, соответственно). Очевидно, это связано с тем, что все три фермента высвобождаются из пораженных гепатоцитов одновременно и попадают в системный кровоток. Следует отметить, что группа больных, не ответивших на лечение, состояла только из мужчин, среди которых 60% имели повышенное значение ГГТП на старте ПВТ. Медиана ГГТП в данной группе составляла 124 МЕ/л (71 - 161 МЕ/л). Медиана ГГТП в группе пациентов, не ответивших на терапию, оказалась в 3,87 раза выше, чем в группе развивших НВО. В данном случае имела место высокая прямая корреляционная зависимость между уровнями ГГТП и АСТ ($r = 0,98$; $p = 0,037$), что является проявлением цитолитического синдрома.

Показатели щелочной фосфатазы у всех пациентов в группе пациентов, развивших НВО, были в пределах нормальных показателей. Медиана составила 65 мкмоль/л (53,75 - 75,25 мкмоль/л). Данный показатель в группе не ответивших на лечение пациентов также был в пределах нормальных значений. Медиана содержания щелочной фосфатазы составляла 54 мкмоль/л (49 - 74 мкмоль/л).

В процессе проведения ПВТ у пациентов, развивших НВО, повышенная активность АлАТ нормализовалась уже к 14 дню от начала терапии, тогда как у пациентов, не ответивших на лечение, повышенная активность АлАТ оставалась на прежнем уровне (более 2 ВГН) (рисунок 7).

Анализ активности АсАТ у пациентов данных двух групп показал, что в группе пациентов, развивших НВО, показатель достигал нормальных значений к 14 дню от старта ПВТ и далее повышения активности не наблюдалось. В группе не ответивших на ПВТ пациентов активность АсАТ оставалась повышенной все время терапии (более 2 ВГН) (рисунок 8).

Нормализация активности ферментов АлАТ и АсАТ совпадала по срокам с негативацией РНК HCV в плазме крови.

Характеристика биохимических показателей у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа), получавших лечение с помощью интерфероновой схемы ПВТ, представлена в таблице 8.

Таким образом, во время ПВТ происходит нормализация биохимических показателей крови вслед за исчезновением ВН ВГС в группе пациентов, достигших НВО, и не происходит таковой в группе пациентов, не развивших вирусологический ответ.

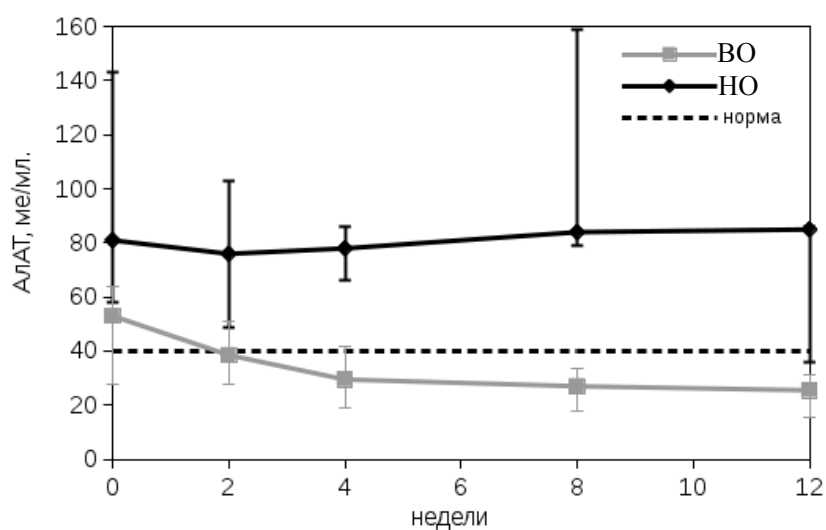


Рисунок 7 – Изменение активности АлАТ у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) в ходе ПВТ

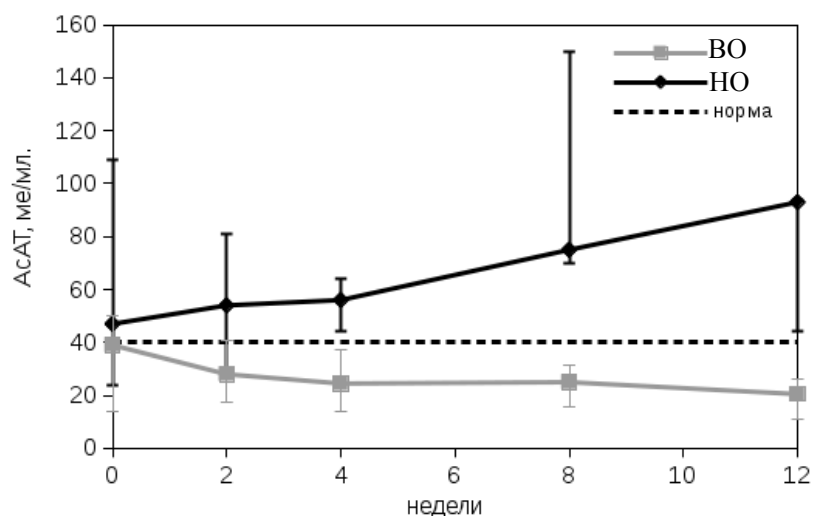


Рисунок 8 – Изменение активности АсАТ у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) в ходе ПВТ

Таблица 8 – Изменение биохимических показателей периферической крови у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) во время проведения ПВТ в интерфероновом режиме

Показатель	Нормальные значения	Эффективность	Срок ПВТ, недели					
			0	2	4	8	12	24
			Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)
Общий билирубин, мкмоль/л	3,4 – 20,5	ВО	14,65 (11,2-17,1)	16,5 (12,8-22,3)	14,1 (11,9-17,0)	14,0 (10,9-16,0)	11,2 (9,0-15,0)	16,0(12,9-18,0)
		НО	19,1(12,6-21,9)	17,0 (16,0-19,0)	17,2 (16,4-24,0)	21,0 (18,5-25,0)	21,0 (19,0-26,0)	-
АлАТ, МЕ/л	Менее 40	ВО	53,0 (42,0-78,0)	38,5 (26,0-49,0)	29,5 (17,0-40,3)	27,0 (20,5-36,3)	25,5 (19,8-35,3)	26,5(20,8-31,0)
		НО	81,0(58,0-143,0)	76,0 (49,0-103,0)	78,0 (66,0-86,0)	84,0 (79,0-159,0)	85,0 (36,0-86,0)	-
АсАТ, МЕ/л	Менее 40	ВО	39,0 (32,0-53,0)	28,0 (22,8-38,8)	24,5 (19,8-34,0)	25,0 (18,8-29,5)	20,5 (16,8-26,3)	22,0(18,0-27,3)
		НО	47,0 (43,0-67,0)	54,0 (45,0-64,0)	56,0 (52,0-56,0)	75,0(43,0-123,0)	93,0 (30,0-94,0)	-
ГГТП, ЕД/л	Ж 5-36 М 8-61	ВО	47,5 (32,0-86,0)	47,5 (39,0-78,0)	37,5 (34,0-53,8)	32,0 (26,0-43,5)	32,0 (25,8-41,3)	33,0(25,5-41,5)
		НО	124,0 (71,0-161,0)	96,0 (95,0-106,0)	95,0 (84,0-164,0)	94,0 (84,0-107,0)	49,0 (40,0-96,0)	-
Щел.фосф, мкмоль/л	Ж 0-240 М 0-270	ВО	65,0 (53,8-75,3)	67,0 (54,0-83,0)	64,5 (53,0-76,5)	64,0 (46,0-68,3)	57,0 (41,8-65,0)	56,5(45,8-71,5)
		НО	54,0 (49,0-74,0)	62,0 (46,0-82,0)	72,0 (68,0-74,0)	75,0(65,0-157,0)	69,0 (67,0-76,0)	-

Примечание: Me – медиана. Q1-Q3 – нижний и верхний квартили.

4.2 Особенности содержания цитокинов/хемокинов в плазме крови пациентов во время ПБТ

Всем пациентам, получившим ПБТ с использованием одного из препаратов интерферона, (41 человек) был проведен анализ содержания цитокинов/хемокинов $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}2\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, CCL2/MCP-1 , $\text{CCL3/MIP-1}\alpha$, CCL8/MCP-2 , CCL20/MIP-3 , CXCL9/MIG , CXCL10/IP-10 , CXCL11/I-TAC перед проведением терапии, во время и по ее окончании.

В группе пациентов, не достигших ВО, наблюдалась высокая обратная корреляция между уровнями $\text{IFN}\gamma$ и CXCL9/MIG ($r=-0,89$; $p=0,037$). Уровень $\text{TNF}\alpha$ показал высокую прямую корреляционную связь с ВН ($r=0,99$; $p=0,001$) и уровнем $\text{CCL3/MIP-1}\alpha$ ($r=0,99$; $p=0,001$) и высокую обратную корреляцию с уровнем CCL20/MIP-3 ($r=-0,89$; $p=0,037$). Была выявлена высокая обратная корреляционная зависимость между уровнем CCL2/MCP-1 и уровнем CXCL11/I-TAC ($r=-0,89$; $p=0,037$) и CCL20/MIP-3 ($r=-0,89$; $p=0,037$). Высокая прямая корреляция наблюдалась между уровнем $\text{CCL3/MIP-1}\alpha$ и ВН ($r=0,99$; $p=0,001$). Высокая обратная корреляция была установлена между уровнями $\text{CCL3/MIP-1}\alpha$ и CCL20/MIP-3 ($r=-0,89$; $p=0,037$), между CCL8/MCP-2 и CXCL10/IP-10 ($r=-0,99$; $p=0,001$), также между уровнями CCL8/MCP-2 и CXCL11/I-TAC ($r=-0,89$; $p=0,037$). Также была установлена высокая обратная корреляционная связь между CXCL9/MIG и ГГТП ($r=-0,89$; $p=0,037$) и между уровнями CXCL9/MIG и $\text{IFN}\gamma$ ($r=-0,89$; $p=0,037$). Также уровни CXCL10/IP-10 и CXCL11/I-TAC высоко коррелировали между собой ($r=0,89$; $p=0,037$).

В группе пациентов, достигших в ходе лечения ВО, были выявлены прямая корреляция между концентрациями $\text{IFN}2\alpha$ и CCL2/MCP-1 ($r=0,38$; $p=0,021$) и обратная корреляция между концентрациями $\text{IFN}\gamma$ и АСТ ($r=-0,34$; $p=0,037$).

Таблица 9 – Содержание цитокинов/хемокинов в плазме крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) без признаков фиброза печени на старте, во время и по завершении ПБТ с использованием интерферонов

Цитокины/ Хемокины, пг/мл	Начало ПБТ			Середина ПБТ			Окончание ПБТ			p(F)
	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
TNF α	11,7	8,9	13,9	14,8	13,8	20,2	16,5	10,9	24,8	0,01
IFN α 2	42,7	14,3	107,2	103,5	46,9	700,6	434,4	28,4	768,4	0,05
IFN γ	3,2	1,7	4,2	3,2	1,7	3,2	3,1	1,7	3,2	0,72
CCL2/MCP-1	369,5	323,4	514,8	614,8	358,0	659,2	430,6	271,4	641,5	0,24
CCL3/MIP-1 α	3,2	3,2	3,7	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	4,1	0,31
CCL8/MCP-2	55,1	31,3	89,8	47,9	38,3	72,1	48,6	34,1	95,1	0,87
CCL20/MIP3 α	9,8	5,2	17,6	9,8	6,9	24,9	12,1	7,3	19,9	0,59
CXCL9/MIG	911,2	629,1	1953,9	942,5	529,6	1389,3	968,1	664,9	1622,1	0,86
CXCL10/IP-10	644,2	367,4	1240,4	745,6	547,1	919,6	717,4	547,1	1000,4	0,95
CXCL11/ITAC	215,7	161,4	589,4	105,4	71,6	137,6	170,3	104,7	436,0	0,01

Уровень TNF α положительно коррелировал с уровнями CXCL10/IP-10 ($r=0,49$; $p=0,002$), CCL2/MCP-1 ($r=0,48$; $p=0,002$), CXCL11/I-TAC ($r=0,35$; $p=0,036$) и CXCL9/MIG ($r=0,39$; $p=0,019$).

У пациентов, получивших ПБТ с использованием интерферонов и достигших НВО, перед проведением терапии была определена стадия фиброза печени с помощью эластометрии. В результате оказалось, что фиброз печени отсутствовал у 18 пациентов (F0), начальная стадия фиброза определялась у 5 пациентов (F1), 10 человек имели более выраженную стадию фиброза печени (F2) и у троих был зарегистрирован фиброз F3.

На основании выявления различных стадий фиброза печени у пациентов перед проведением ПБТ, они были разделены на две группы:

I группа – пациенты без фиброза печени – F0.

II группа – пациенты, имеющие различные стадии фиброза печени, – F1, F2 и F3.

Далее проведены исследования содержания цитокинов/хемокинов в динамике ПБТ у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) без признаков фиброза

печени. Медианные значения (Me) и интерквартильный размах (Q1-Q3) концентраций цитокинов/хемокинов у пациентов 1-ой группы до, во время и по окончании ПВТ представлены в таблице 9. Достоверность различий концентраций в динамике терапии (p) была получена с использованием теста Фридмана.

Наиболее значимыми были изменения концентрации хемокина CXCL11/ITAC. На момент начала терапии медиана концентрации CXCL11/ITAC составляла 215,7 пг/мл и была выше медианы данного показателя в группе условно здоровых лиц в 2,8 раза. К середине ПВТ (12 неделя) медианы концентраций данного хемокина у пациентов I-й группы и условно здоровых лиц стали почти одинаковыми (105,4 и 77,5 пг/мл соответственно), а к окончанию лечения медиана концентрации CXCL11/ITAC вновь стала превышать медиану у условно здоровых лиц в 2,2 раза (рисунок 9).

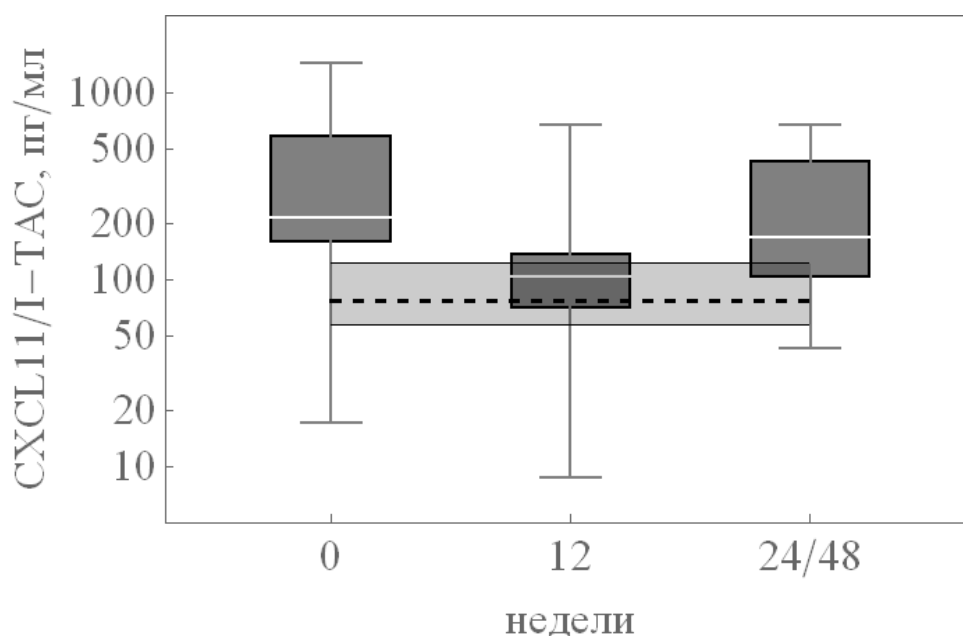


Рисунок 9 – Диаграммы размаха (box-and-whiskers) для концентрации хемокина CXCL11/ITAC в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым цветом)

Хемокин CXCL11/ITAC и хемокины CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 являются лигандами CXCR3 рецептора Т- и В-лимфоцитов. При ХГС происходит активная

репликация вируса в гепатоцитах, в ответ на которую клетки печени (гепатоциты, дендритные клетки и клетки Купфера) продуцируют хемокины CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC. Данные вещества обладают хемоаттрактантной активностью по отношению к Т- и В-лимфоцитам, экспрессирующим на своей поверхности CXCR3 рецептор. В ходе ПВТ происходит эрадикация ВГС из гепатоцитов и снижается высвобождение этих хемокинов пораженными клетками.

Обращает на себя внимание увеличение концентрации $\text{TNF}\alpha$ в середине (12 неделя) и в конце терапии (достоверность $p=0,006$ и $p=0,01$ соответственно). Этот показатель был выше, чем в группе условно здоровых лиц в 1,7 раза к 12 неделе терапии и уже в 2,7 раза к ее окончанию. Изменения концентрации $\text{TNF}\alpha$ в процессе ПВТ представлены на рисунке 10.

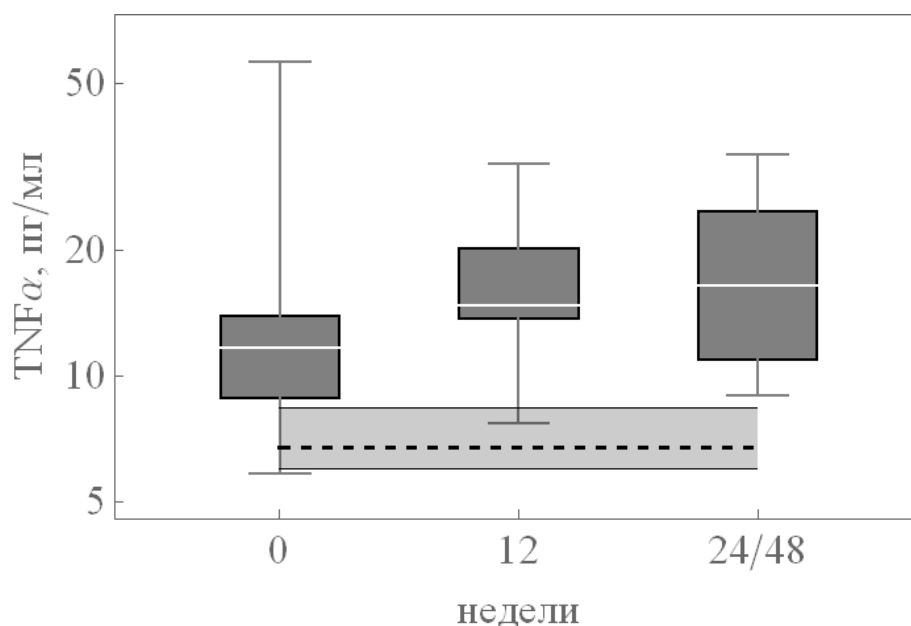


Рисунок 10 – Диаграммы размаха (box-and-whiskers) для концентрации фактора некроза опухоли в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым цветом)

Следующим этапом стал анализ изменения концентраций цитокинов/хемокинов для второй группы пациентов. Медианные значения (Me) и интерквартильный размах (Q1-Q3) для исследуемых цитокинов/хемокинов до, во

время и по окончании ПБТ представлены в таблице 10. Достоверность различий p , полученная с использованием теста Фридмана, указана в последнем столбце таблицы.

Таблица 10 – Содержание цитокинов/хемокинов в плазме крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) с различной стадией фиброза печени на старте, во время и по завершении ПБТ с использованием интерферонов

Цитокины/ Хемокины, пг/мл	Начало ПБТ			Середина ПБТ			Окончание ПБТ			P(F)
	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
TNF α	12,8	8,6	14,6	16,8	10,8	21,3	13,4	5,7	20,9	0,29
IFN α 2	38,5	3,2	71,5	134,8	38,7	450,3	121,6	44,8	529,3	0,04
IFN γ	2,3	1,0	3,2	3,2	1,5	3,7	3,2	1,8	3,7	0,51
CCL2/MCP-1	352,3	286,9	393,5	547,7	368,9	777,3	325,0	277,9	462,3	0,04
CCL3/MIP-1 α	3,2	3,2	4,7	3,2	2,6	3,2	3,2	3,0	4,3	0,37
CCL8/MCP-2	69,0	18,1	140,4	52,5	37,9	78,6	52,4	21,8	83,1	0,97
CCL20/MIP3 α	14,1	10,2	18,9	16,0	9,7	20,1	17,0	8,6	24,5	0,88
CXCL9/MIG	1477,4	958,7	2345,6	1095,6	721,2	1946,8	1553,3	800,7	2457,8	0,61
CXCL10/IP-10	702,6	453,3	1015,4	597,9	421,8	874,3	332,7	264,9	769,3	0,12
CXCL11/ITAC	160,4	132,6	370,9	138,4	98,3	333,8	338,1	127,0	559,3	0,37

Во время проведения статистического анализа исследуемых цитокинов/хемокинов было обнаружено достоверно значимое увеличение концентрации CCL2/MCP-1 во время терапии в сравнении с концентрацией перед началом лечения с достоверностью $p=0,04$. Концентрация хемокина CCL2/MCP-1 превышала таковую в группе условно здоровых лиц в начале, на 12 неделе и по окончании лечения в 2,5; 3,5 и в 2,4 раза соответственно. Изменение концентрации данного показателя (CCL2/MCP-1) показаны на рисунке 11.

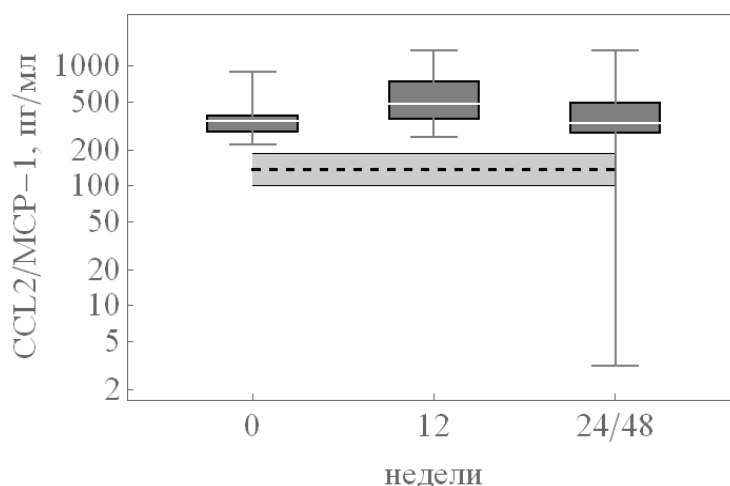


Рисунок 11 – Диаграмма размаха (box-and-whiskers) для концентрации хемокина CCL2/MCP-1 в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым цветом)

Таким образом, выраженные изменения концентрации хемокина CXCL11/ITAC в группе пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) с отсутствием признаков фиброза печени в процессе ПВТ, а также изменения концентрации хемокина CCL2/MCP-1 в группе пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа), имеющих различные стадии фиброза печени, во время ПВТ совпадают по срокам с периодом полной эрадикации ВГС из периферической крови пациентов к 4 - 12 неделе лечения и являются следствием уменьшения количества пораженных ВГС клеток печени.

4.3 Особенности содержания субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6, в периферической крови пациентов во время ПВТ

У пациентов, получавших ПВТ с использованием интерферона, также определяли содержание CXCR3⁺ и CCR6⁺ Т-клеток, CTL, NK-клеток, NKT-клеток и В-лимфоцитов, используя метод проточной цитофлюориметрии.

Статистическую обработку данных проводили с учетом разделения пациентов на две группы по признаку отсутствия или наличия фибротических изменений печени:

I группа – отсутствие фиброза в ткани печени (F0).

II группа – наличие фиброза в ткани печени (F1-F3).

Ниже показаны результаты изменения содержания CXCR3+ и CCR6+ Т-клеток, Th, CTL, НК-клеток, NKT-клеток и В-лимфоцитов в процессе ПБТ для первой группы пациентов. Медианные значения (Me) и интерквартильный размах (Q1-Q3) для содержания CXCR3+ и CCR6+ лимфоцитов до, во время и по окончании ПБТ представлены в таблице 11. Для сравнения содержания лимфоцитов в трех точках был использован тест Фридмана (достоверность различий p указана в последнем столбце таблицы).

Таблица 11 – Количественная характеристика субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3 в крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) с отсутствием признаков фиброза печени до, во время и по окончании ПБТ с использованием интерферонов

Лимфоциты		Начало ПБТ			Середина ПБТ			Окончание ПБТ			p(F)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
Лимфоциты	%	39,3	34,1	45,9	43,9	34,6	47,0	37,4	28,4	39,2	0,30
	10 ⁹	1,82	1,40	2,45	1,26	1,06	1,64	1,02	0,93	1,99	0,03
Т-лимфоциты	%	76,8	73,4	79,8	80,5	75,8	83,4	76,1	71,0	81,1	0,35
	10 ⁹	1,31	1,09	1,86	1,03	0,86	1,41	0,84	0,69	1,41	0,04
Т-хелперы	%	42,8	36,4	45,5	43,7	40,7	51,8	41,5	35,9	50,3	0,53
	10 ⁹	0,79	0,61	0,97	0,58	0,49	0,68	0,55	0,42	0,75	0,02
CXCR3+ Т-клетки	%	36,5	29,7	43,2	48,2	36,3	51,6	39,3	33,7	49,5	0,11
	10 ⁹	0,49	0,40	0,70	0,48	0,37	0,67	0,39	0,24	0,56	0,31
CCR6+ Т-клетки	%	19,7	14,2	21,5	18,0	15,9	24,5	17,3	14,5	20,3	0,56
	10 ⁹	0,26	0,22	0,30	0,20	0,18	0,35	0,18	0,11	0,22	0,01
CXCR3+ Т-хелперы	%	34,7	26,3	42,7	44,3	36,9	51,0	39,8	27,7	44,2	0,081
	10 ⁹	0,26	0,20	0,33	0,27	0,21	0,34	0,20	0,14	0,28	0,29
CCR6+ Т-хелперы	%	24,4	20,2	28,3	28,9	25,7	31,9	29,3	22,8	31,1	0,35
	10 ⁹	0,19	0,16	0,24	0,16	0,13	0,22	0,16	0,11	0,19	0,40
CTL	%	30,4	21,6	35,7	29,4	24,8	35,7	29,8	26,7	33,2	0,92
	10 ⁹	0,49	0,34	0,84	0,34	0,26	0,53	0,40	0,23	0,65	0,27

Продолжение таблицы 11

Лимфоциты		Начало ПБТ			Середина ПБТ			Окончание ПБТ			p(F)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
CXCR3+ CTL	%	31,5	25,6	41,4	43,6	31,3	54,0	24,3	17,5	39,6	0,04
	10 ⁹	0,18	0,11	0,27	0,16	0,12	0,21	0,12	0,06	0,17	0,26
CCR6+ CTL	%	7,9	5,2	11,0	8,0	4,9	11,7	6,5	5,3	11,9	0,99
	10 ⁹	0,044	0,026	0,062	0,025	0,017	0,048	0,034	0,016	0,064	0,286
В-лимфоциты	%	8,8	6,4	10,6	6,5	5,0	10,3	8,8	5,3	11,4	0,54
	10 ⁹	0,18	0,11	0,22	0,08	0,06	0,15	0,10	0,05	0,23	0,19
CXCR3+ В-лимфоциты	%	15,1	10,0	18,2	14,9	10,3	23,0	6,3	3,5	7,9	0,01
	10 ⁹	0,02	0,01	0,04	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01
CCR6+ В-лимфоциты	%	95,7	92,2	97,2	90,8	85,9	94,3	96,1	91,7	9,4	0,02
	10 ⁹	0,17	0,10	0,21	0,08	0,05	0,15	0,09	0,04	0,21	0,19
NK-клетки	%	10,4	7,9	14,5	10,5	7,8	15,5	13,9	11,3	15,1	0,34
	10 ⁹	0,16	0,12	0,31	0,15	0,10	0,20	0,13	0,11	0,30	0,50
CXCR3+ NK-клетки	%	8,0	4,6	10,2	11,7	8,8	25,2	17,8	7,2	32,9	0,01
	10 ⁹	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,03	0,02	0,04	0,04
CCR6+ NK-клетки	%	3,0	2,7	4,3	5,7	3,4	8,8	4,0	1,8	8,4	0,143
	10 ⁹	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,89
NKT-клетки	%	2,6	1,6	5,9	2,4	1,4	4,0	1,9	1,1	3,0	0,40
	10 ⁹	0,07	0,02	0,11	0,04	0,02	0,06	0,02	0,01	0,05	0,06
CXCR3+ NKT-клетки	%	21,1	15,7	27,0	18,5	11,9	22,7	19,2	9,1	29,4	0,80
	10 ⁹	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04
CCR6+ NKT-клетки	%	11,2	7,4	21,1	16,4	10,6	20,8	17,9	10,2	26,5	0,47
	10 ⁹	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05

У пациентов первой группы были обнаружены достоверные изменения абсолютных значений некоторых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов. При этом наблюдалось уменьшение их содержания в ходе терапии, что, скорее всего, связано с угнетающим действием лекарственных препаратов. У пациентов I группы было обнаружено увеличение процентного содержания CXCR3+ CTL к 12-й неделе лечения и дальнейшее снижение к завершению с достоверностью

$p=0,03$. Несмотря на обнаруженное увеличение этого показателя, максимальное его значение на 12 неделе терапии в 1,5 раза меньше, чем таковое в группе условно здоровых лиц. Различие содержания CXCR3+ CTL во время ПБТ представлено на рисунке 12.

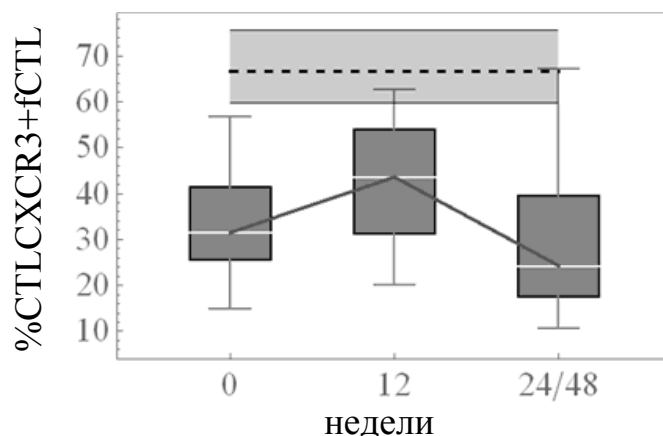


Рисунок 12 – Диаграммы размаха (box-and-whiskers) для процентного содержания CXCR3+ CTL в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым цветом)

Также имело место увеличение относительного содержания CXCR3+ NK во время ПБТ ($p=0,01$). Однако, как и в случае с CXCR3+ CTL, содержание не достигает такового значения у условно здоровых лиц. В начале терапии относительное содержание CXCR3+ NK почти в 5 раз меньше, чем у группы условно здоровых лиц, а к окончанию терапии стало только в 2 раза меньше. Изменения относительного содержания CXCR3+ NK во время ПБТ представлены на рисунке 13.

В течение терапии был получен В-клеточный ответ у пациентов этой группы. Содержание В-лимфоцитов с CXCR3 рецептором перед началом терапии в крови пациентов превышало нормальные значения в 2,9 раза. Но к окончанию лечения медиана этого показателя стала равной значению показателя в группе условно здоровых лиц. Изменения содержания В-лимфоцитов с CXCR3 рецептором у пациентов представлены на рисунке 14.

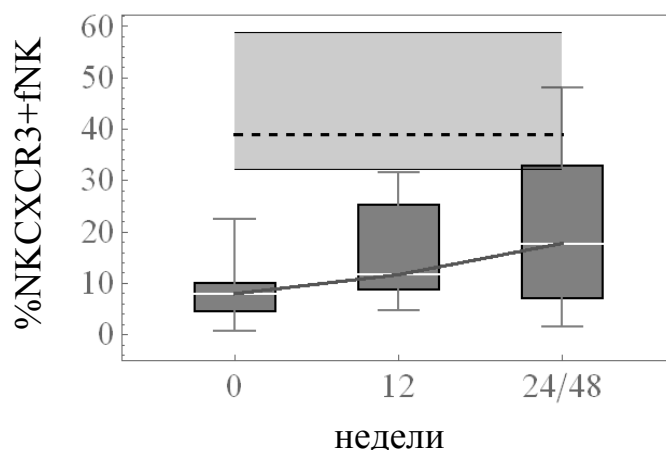


Рисунок 13 – Диаграммы размаха (box-and-wiskers) для процентного содержания CXCR3+ НК в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым цветом)

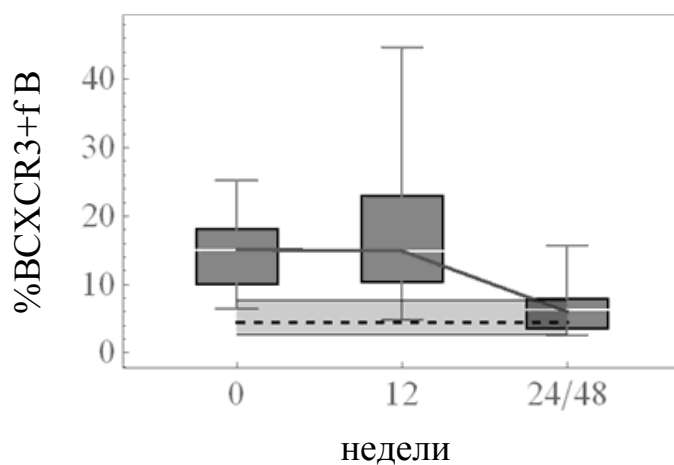


Рисунок 14 – Диаграмма размаха (box-and-wiskers) для процентного содержания CXCR3+ В-лимфоцитов в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым цветом)

Таким образом, по мере достижения НВО снижается процентное содержание В-лимфоцитов с CXCR3, что говорит в пользу нормализации гуморального иммунного ответа.

Далее были рассмотрены результаты изменения процентного содержания CXCR3+ и CCR6+ Т-клеток, Th, CTL, NK-клеток, NKT-клеток и В-лимфоцитов в ходе ПБТ для второй группы пациентов. Медианные значения (Me) и интерквартильный размах (Q1, Q3) для содержания CXCR3+ и CCR6+ лимфоцитов до, вовремя и по окончании ПБТ представлены в таблице 12. Достоверность различий на разных этапах терапии (p) была исследована с использованием теста Фридмана.

Таблица 12 – Количественная характеристика субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3, в крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) с различной стадией фиброза печени до, во время и по окончании ПБТ с использованием интерферонов

Лимфоциты		Начало ПБТ			Середина ПБТ			Окончание ПБТ			p(F)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
Лимфоциты	%	30,2	28,6	40,4	29,9	26,2	35,2	29,9	22,5	34,1	0,686
	10 ⁹	1,8	1,7	2,7	1,1	1,0	1,5	0,9	0,8	1,3	0,001
Т-лимфоциты	%	76,7	68,1	81,9	77,7	73,4	81,0	67,8	64,6	75,6	0,218
	10 ⁹	1,34	1,25	1,99	0,88	0,74	1,11	0,70	0,64	0,95	0,001
Т-хелперы	%	42,2	39,6	44,3	48,5	40,1	52,7	41,7	38,3	48,5	0,443
	10 ⁹	0,74	0,72	1,33	0,51	0,37	0,67	0,42	0,30	0,57	0,002
CXCR3+ Т-лимфоциты	%	43,4	36,3	50,9	44,0	40,4	52,8	45,9	38,2	57,1	0,840
	10 ⁹	0,58	0,51	0,74	0,40	0,30	0,58	0,31	0,24	0,40	0,006
CCR6+ Т-лимфоциты	%	22,0	19,0	25,4	17,8	14,9	20,4	21,0	19,5	26,8	0,139
	10 ⁹	0,30	0,26	0,39	0,14	0,12	0,17	0,14	0,12	0,18	0,005
CXCR3+ Т-хелперы	%	41,8	28,3	48,5	40,5	35,9	44,9	37,7	34,3	57,0	0,856
	10 ⁹	0,30	0,27	0,39	0,22	0,13	0,30	0,16	0,12	0,32	0,056
CCR6+ Т-хелперы	%	29,8	24,3	41,0	28,4	21,1	33,5	33,8	33,4	43,8	0,197
	10 ⁹	0,28	0,21	0,32	0,12	0,10	0,17	0,13	0,10	0,26	0,002
CTL	%	28,2	19,1	31,0	25,8	22,2	28,5	25,4	24,5	25,8	0,936
	10 ⁹	0,48	0,36	0,70	0,25	0,18	0,31	0,23	0,17	0,37	0,003
CXCR3+ CTL	%	32,5	28,7	40,3	33,1	29,7	45,4	25,0	21,7	30,0	0,110
	10 ⁹	0,17	0,13	0,25	0,08	0,05	0,17	0,09	0,04	0,14	0,012
CCR6+ CTL	%	7,7	3,4	10,7	8,9	5,1	12,6	12,0	8,8	13,5	0,248
	10 ⁹	0,03	0,02	0,04	0,02	0,01	0,05	0,03	0,02	0,06	0,32

Продолжение таблицы 12

Лимфоциты		Начало ПБТ			Середина ПБТ			Окончание ПБТ			p(F)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
В-лимфоциты	%	10,4	8,7	14,5	6,7	4,3	9,9	8,5	5,9	12,3	0,117
	10 ⁹	0,27	0,18	0,31	0,06	0,05	0,10	0,13	0,06	0,21	0,001
CXCR3+ В-лимфоциты	%	18,3	7,0	25,6	10,5	8,9	18,1	11,1	6,5	17,7	0,542
	10 ⁹	0,04	0,02	0,06	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,003
CCR6+ В-лимфоциты	%	90,4	89,8	92,8	89,0	85,8	92,2	87,8	76,5	95,1	0,442
	10 ⁹	0,25	0,16	0,29	0,06	0,04	0,09	0,12	0,05	0,20	0,002
NK-клетки	%	10,6	7,8	18,8	14,3	10,6	18,5	16,7	13,4	19,6	0,574
	10 ⁹	0,29	0,19	0,36	0,15	0,11	0,20	0,15	0,10	0,21	0,018
CXCR3+ NK-клетки	%	8,1	2,5	11,7	16,6	11,7	29,3	28,5	13,7	33,1	0,004
	10 ⁹	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,04	0,001
CCR6+ NK-клетки	%	4,5	2,4	6,1	8,2	5,5	12,3	10,5	2,4	15,7	0,234
	10 ⁹	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,825
NKT-клетки	%	5,1	1,4	6,8	3,8	3,0	5,7	2,0	0,6	3,5	0,096
	10 ⁹	0,10	0,03	0,12	0,04	0,03	0,06	0,01	0,01	0,06	0,036
CXCR3+ NKT-клетки	%	19,6	13,2	49,2	28,2	21,6	36,9	24,3	15,1	35,6	0,876
	10 ⁹	0,01	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,089
CCR6+ NKT-клетки	%	9,3	6,6	12,4	13,4	10,1	18,9	20,8	13,0	35,2	0,045
	10 ⁹	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,369

По результатам проведенного проточного цитометрического анализа у пациентов второй группы было обнаружены достоверные изменения абсолютных значений субпопуляций Т- и В-лимфоцитов. При этом наблюдалось уменьшение их содержания в ходе терапии, что, скорее всего, связано с угнетающим действием лекарственных препаратов. В данной группе пациентов обнаружено увеличение относительного содержания CXCR3+ NK с достоверностью $p=0,004$. Максимальное нарастание содержания CXCR3+ NK в периферической крови у пациентов было зафиксировано к окончанию терапии. Перед стартом ПБТ содержание CXCR3+ NK было в 11,4 раза меньше содержания этого показателя в периферической крови в группе условно здоровых лиц, а на момент окончания

лечения стало всего в 1,3 раза меньше. Изменения процентного содержания CXCR3+ NK в ходе ПБТ представлены на рисунке 15.

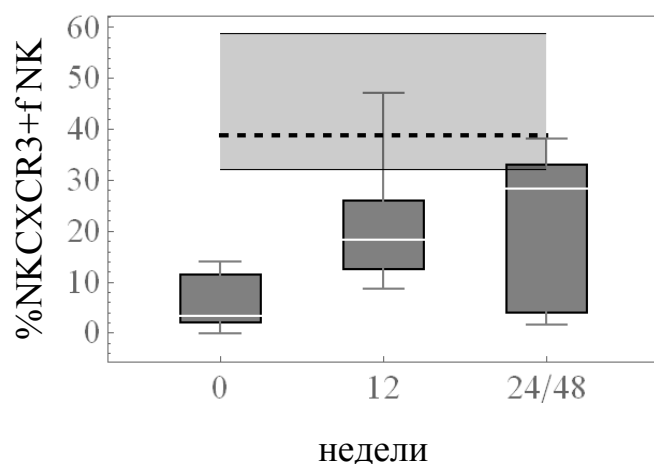


Рисунок 15 – Диаграммы размаха (box-and-wiskers) для процентного содержания CXCR3+ NK в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым цветом)

Таким образом, мы наблюдаем в ходе терапии резкое увеличение содержания CXCR3+ NK, однако значения к окончанию терапии остаются несколько меньше нормальных значений данного показателя.

Одновременно с изменением CXCR3+ NK в периферической крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) было выявлено увеличение относительного содержания CCR6+ NKT во время проведения ПБТ. На старте терапии оказалось, что содержания CCR6+ NKT было меньше, чем у условно здоровых лиц в 6 раз. Однако к окончанию терапии этот показатель был всего в 2,6 раза меньше, чем в группе условно здоровых лиц. Динамика изменения содержания CCR6+ NKT клеток в ходе ПБТ показана на рисунке 16.

Таким образом, увеличение содержания CXCR3+ NK и CCR6+ NKT в периферической крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) во время проведения ПБТ с использованием интерферона указывает на активацию клеток врожденного звена иммунитета в ответ на применение для лечения ХГС препаратов эндогенного интерферона.

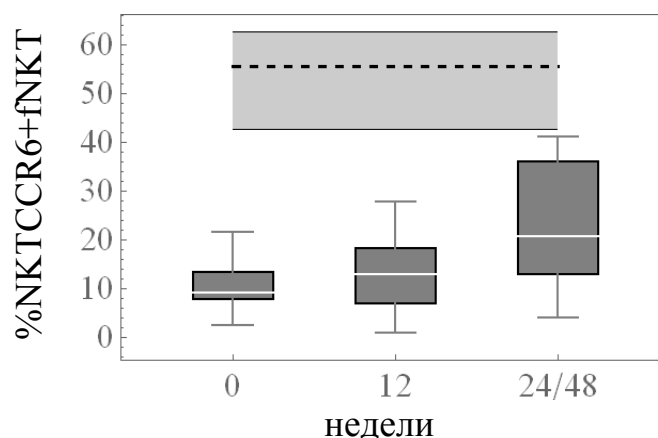


Рисунок 16 – Диаграммы размаха (box-and-wiskers) для процентного содержания CCR6+ NKT в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым цветом)

4.4 Сравнительный анализ иммунологических показателей у пациентов, достигших и не достигших вирусологического ответа перед проведением ПВТ с использованием интерферона

Актуальной задачей на настоящий момент является поиск предиктора результата терапии с использованием интерферонов, применение которого облегчило бы задачу подбора схем ПВТ и тактики ведения пациента во время ее проведения. В таблице 13 представлены результаты статистической обработки данных, полученных в ходе исследования, позволяющих выделить предиктор результата ПВТ из системы хемокинов.

Для этой цели все пациенты были разделены на 2 группы:

I группа была представлена пациентами, развившими НВО в ходе терапии, и состояла из 36 человек,

II группа была представлена пациентами, не достигшими ВО, и состояла из 5 человек.

В таблице 13 представлены данные по содержанию исследуемых цитокинов/хемокинов в группах пациентов, развивших и не развивших ВО. Приведены медианы Me, нижний и верхний квартили Q1, Q3, а также величины достоверности (p) различия выборок, полученные с помощью теста Манна-Уитни. В таблице 14 приведены аналогичные данные по содержанию лимфоцитов.

Таблица 13 – Содержание цитокинов/хемокинов у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) двух групп (развивших и не развивших НВО) перед началом ПБТ

Цитокины/ хемокины, пг/мл	НВО			НО			Р (MY)
	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
TNF α	11,70	7,93	13,78	14,26	12,22	18,11	0,090
IFN α 2	38,46	3,19	109,36	28,39	12,95	45,67	0,585
IFN γ	3,19	1,56	3,37	3,19	2,20	4,79	0,505
CCL2/MCP-1	352,79	294,32	431,62	370,98	324,61	415,99	0,676
CCL3/MIP-1 α	3,19	3,19	4,13	3,19	2,71	4,42	0,515
CCL8/MCP-2	56,81	26,63	89,88	25,75	24,50	36,23	0,130
CCL20/MIP3 α	11,80	6,62	17,05	46,22	22,88	56,08	0,009
CXCL9/MIG	974,11	671,22	2011,53	1066,71	875,55	3224,47	0,368
CXCL10/IP-10	674,58	407,57	1143,15	781,89	674,63	3640,39	0,116
CXCL11/ITAC	175,64	131,77	355,55	227,10	140,80	265,83	0,902

Известно, что хемокин CXCL10/IP-10 является предиктором отсутствия ответа на ПБТ с использованием интерферонов [39,141]. По нашим данным, приведенным в таблице 13, достоверных различий концентрации CXCL10/IP-10 не было обнаружено. Достоверным оказалось различие между концентрациями CCL20/MIP3 α на старте терапии у пациентов, развивших впоследствии НВО, и у пациентов, не достигших ВО при проведении ПБТ ($p=0,009$). Обращает на себя внимание тот факт, что медиана значений концентраций CCL20/MIP3 α у пациентов, не достигших ВО, была выше, чем у ответивших на лечение, в 4 раза. Различия между концентрациями хемокина CCL20/MIP3 α показаны на рисунке 17.

Таблица 14 – Содержание лимфоцитов у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) двух групп (развивших и не развивших НВО) перед началом ПВТ

Лимфоциты		НВО			НО			p(M-W)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
Лимфоциты	%	35,50	30,30	44,45	37,20	33,90	49,80	0,364
	10 ⁶	1,82	1,59	2,53	2,08	1,93	2,42	0,350
Т-лимфоциты	%	76,30	69,70	79,70	79,60	77,73	79,90	0,192
	10 ⁶	1,315	1,199	1,931	1,656	1,514	1,905	0,233
Т-хелперы	%	42,50	38,85	45,15	41,20	38,80	56,08	0,706
	10 ⁶	0,768	0,642	1,065	1,184	0,749	1,234	0,213
CXCR3+ Т-клетки	%	39,60	33,95	43,75	42,40	40,18	47,23	0,280
	10 ⁶	0,56	0,479	0,713	0,656	0,629	0,824	0,06
CCR6+ Т-клетки	%	19,80	15,80	23,10	15,80	14,75	23,78	0,706
	10 ⁶	0,273	0,242	0,315	0,266	0,238	0,437	0,782
CXCR3+ Т-хелперы	%	38,05	26,55	44,25	40,50	24,60	47,03	0,900
	10 ⁶	0,283	0,219	0,339	0,295	0,278	0,434	0,276
CCR6+ Т-хелперы	%	25,45	22,80	33,55	19,40	17,15	32,10	0,422
	10 ⁶	0,216	0,165	0,276	0,207	0,182	0,328	0,678
CTL	%	27,35	19,30	32,60	30,20	21,53	32,93	0,598
	10 ⁶	0,485	0,343	0,753	0,595	0,464	0,708	0,35
CXCR3+CTL	%	32,45	27,40	41,20	41,40	34,28	42,70	0,280
	10 ⁶	0,177	0,127	0,255	0,185	0,177	0,289	0,299
CCR6+ CTL	%	7,0	5,00	10,90	7,10	6,55	24,20	0,379
	10 ⁶	0,038	0,021	0,052	0,033	0,03	0,173	0,35
В-лимфоциты	%	9,45	7,75	13,90	10,30	8,88	10,90	0,821
	10 ⁶	0,2	0,159	0,278	0,223	0,171	0,258	0,836
CXCR3+ В-лимфоциты	%	15,45	9,45	22,55	17,10	9,75	21,25	0,782
	10 ⁶	0,035	0,016	0,042	0,038	0,017	0,056	0,499
CCR6+В-лимфоциты	%	92,40	90,15	96,45	96,00	94,53	97,50	0,108
	10 ⁶	0,171	0,153	0,269	0,214	0,164	0,248	0,568

Продолжение таблицы 14

Лимфоциты		НВО			НО			p(M-W)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
NK-клетки	%	10,45	8,05	16,80	9,20	8,40	10,98	0,581
	10 ⁶	0,217	0,138	0,346	0,191	0,171	0,259	0,958
CXCR3+ NK-клетки	%	7,70	2,70	10,80	7,40	4,90	7,63	0,688
	10 ⁶	0,013	0,008	0,019	0,014	0,009	0,016	0,876
CCR6+ NK-клетки	%	3,05	2,50	4,60	2,40	2,28	3,95	0,498
	10 ⁶	0,007	0,004	0,009	0,006	0,005	0,008	0,755
NKT-клетки	%	3,35	1,60	6,45	1,40	0,88	5,35	0,393
	10 ⁶	0,075	0,023	0,115	0,022	0,019	0,147	0,716
CXCR3+ NKT-клетки	%	20,00	14,75	38,30	13,60	11,88	18,48	0,126
	10 ⁶	0,013	0,004	0,022	0,004	0,002	0,02	0,406
CCR6+ NKT-клетки	%	9,95	7,65	15,40	21,00	10,75	29,88	0,238
	10 ⁶	0,007	0,004	0,015	0,004	0,003	0,025	0,678

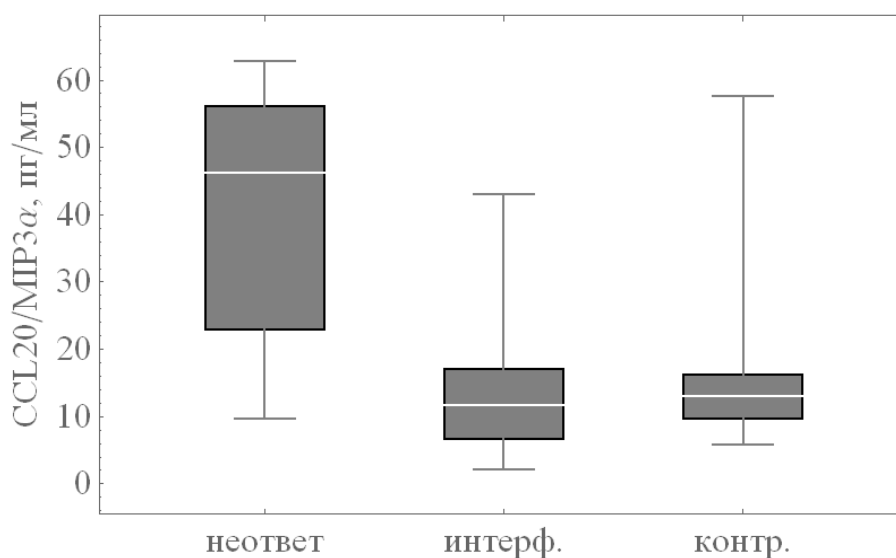


Рисунок 17 – Диаграмма размаха (box-and-whiskers) для концентрации CCL20/MIP3α у пациентов, ответивших и неответивших на терапию, перед ее началом в сравнении с контрольной группой

Следует отметить, что наблюдалась некоторая тенденция к различию медианных концентраций $\text{TNF}\alpha$ у пациентов этих двух групп. Концентрация $\text{TNF}\alpha$ у пациентов, не ответивших на лечение, перед проведением терапии была выше, чем у пациентов, развивших НВО в ходе ПБТ, в 1,3 раза. Однако различие было незначимым ($p=0,09$). Данные, отражающие изменения концентрации $\text{TNF}\alpha$, представлены на рисунке 18.

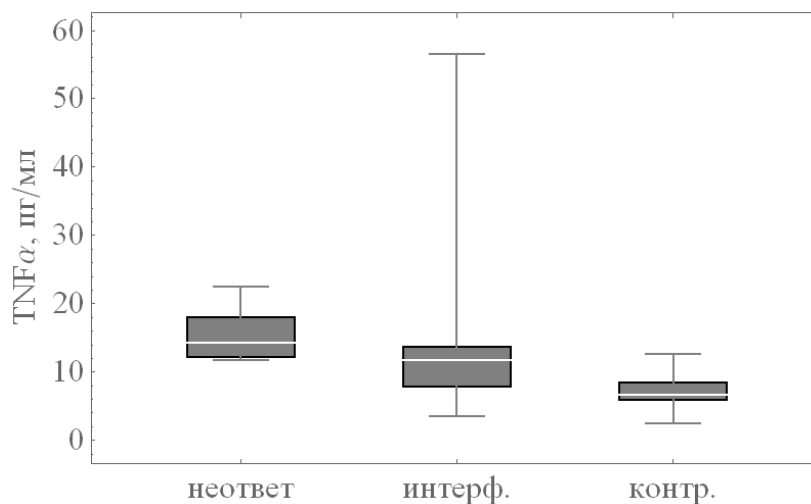


Рисунок 18 – Диаграмма размаха (box-and-wiskers) для концентрации $\text{TNF}\alpha$ у пациентов, ответивших и не ответивших на терапию, перед ее началом в сравнении с контрольной группой

В результате сравнения субпопуляций лимфоцитов у пациентов, достигших и не достигших ВО, перед проведением терапии не было обнаружено достоверных различий.

Анализ показывает, что цитокины/хемокины $\text{TNF}\alpha$ и $\text{CCL20/MIP3}\alpha$ могут быть использованы для разделения пациентов на достигших и не достигших вирусологического ответа перед проведением ПБТ с использованием интерферона. Чтобы характеризовать эффективности такого разделения, были построены зависимости чувствительности и специфичности алгоритма бинарной классификации от порогового значения концентрации данных биомаркеров (ROC-кривые, рисунок 19). Были рассчитаны площади под этими кривыми (ППК). Для $\text{CCL20/MIP3}\alpha$ (рисунок 19, слева) было получено большое значение $\text{ППК}=0,86$. ППК для биомаркера $\text{TNF}\alpha$ оказалась меньше (0,73 - рисунок 19, справа). ROC-

анализ дал оптимальное значение пороговой концентрации $CCL20/MIP3\alpha < 25$ пг/мл для предсказания достижения вирусологического ответа. Ей соответствует максимальное значение суммы специфичности и чувствительности, при этом чувствительность составляет 91%, а специфичность - 80% (рисунок 19, левая панель). ROC-анализ с использованием $TNF\alpha$ дал оптимальный критерий наличия ВО $< 11,8$ пг/мл, которому соответствует максимальное значение суммы специфичности и чувствительности, а чувствительность составляет 56%, и специфичность - 100% (рисунок 19, правая панель).

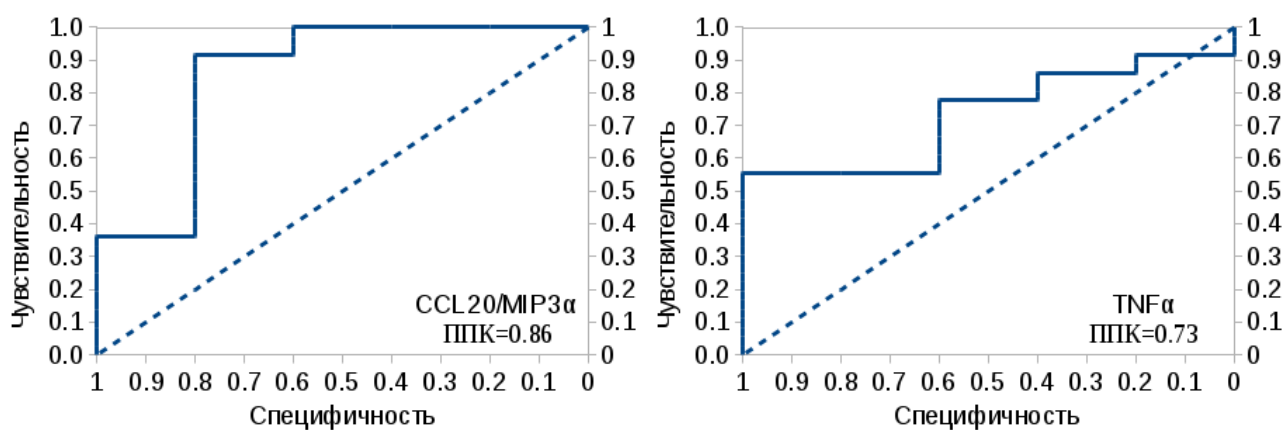


Рисунок 19 – Соотношение между чувствительностью и специфичностью алгоритма предсказания эффективности терапии (ROC-кривые) с использованием интерферона альфа при изменении порогового значения концентрации $CCL20/MIP3\alpha$ (слева) и $TNF\alpha$ (справа).

Для предсказания результата терапии с учетом обоих параметров в программе R было построено «дерево решений». При его построении проводился автоматический перебор различных последовательностей использования указанных параметров и определение для каждого из них граничного значения, которое разделяет всех пациентов на группы, содержащие преимущественно ответчиков и неответчиков на терапию по критерию наибольшей чистоты обеих групп. При использовании только $CCL20/MIP3\alpha$ при построении «дерева решения» было получено то же граничное значение, что и в ROC-анализе (25 пг/мл). При построении «дерева решений» (рисунке 20) были использованы

данные по содержанию фактора некроза опухоли и хемокина CCL20/MIP3 α , которые дали возможность более точно отнести пациентов к группе ответивших на лечение. Пороговое значение для этого параметра оказалось равным 14 пг/мл.

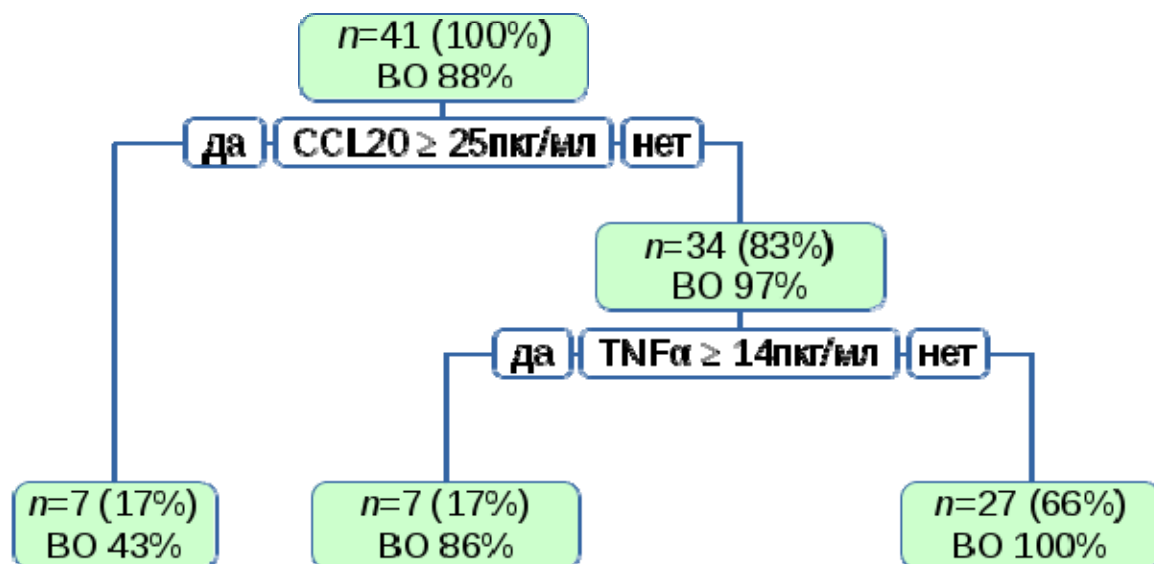


Рисунок 20 – «Дерево решений» для определения пациентов в группы ответивших и неответивших на терапию с использованием уровня цитокинов/хемокинов CCL20/MIP3 α и TNF α .

Для каждой группы указано число пациентов в ней (n) и их доля от полного числа пациентов в скобках, а также доля пациентов, продемонстрировавших вирусологический ответ (BO) в данной группе.

Таким образом, анализ содержания цитокинов/хемокинов TNF α , IFN α 2, IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC в периферической крови больных перед началом терапии с использованием интерферонов в группах пациентов, развивших и не развивших вирусологический ответ, даёт возможность предложить хемокин CCL20/MIP3 α на роль предиктора результата терапии. Концентрация этого хемокина в плазме крови пациентов, не ответивших на терапию, была более чем в 4 раза выше, чем у пациентов, ответивших на нее.

ГЛАВА 5 КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПВТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЗИНТЕРФЕРОНОВОГО РЕЖИМА ТЕРАПИИ

5.1 Клинико-лабораторная характеристика пациентов во время проведения ПВТ

Противовирусную терапию в безинтерфероновом режиме получили в формате данного исследования 14 пациентов. Соотношение мужчин и женщин составило 1:2,5 (четыре мужчины и десять женщин соответственно). Возраст пациентов был от 33 до 71 года, с медианой $48,2 \pm 13,6$ лет.

8 пациентов (57,1%) имели срок инфицирования, равный 10 или более годам, остальные 6 пациентов (42,8%) узнали о своем заболевании менее 10 лет назад.

Распределение пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) в зависимости от стадии фиброза печени представлено на рисунке 21.

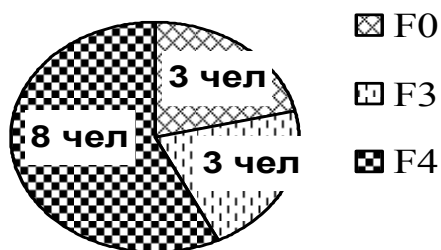


Рисунок 21 – Распределение пациентов с ХГС (ВГС 1 генотипа) в зависимости от стадии фиброза печени

Цирротическая стадия ХГС была обнаружена у 8 человек (57,1%). У больных этой группы было зафиксировано проявление цирротической стадии – варикозно расширенные вены пищевода (ВРВП). Чаще всего было выявлено ВРВП I степени у 4 больных (50%), немного реже наблюдалось ВРВП II степени у 4 человек (37,5%) и у одного пациента (12,5%) диагностировали ВРВП III

степени. Все пациенты у которых имелась цирротическая стадия ХГС имели срок инфицирования больше 10 лет, у них была выявлена прямая корреляционная зависимость между сроком инфицирования и выраженностью фибротических изменений печени ($r=0,76$; $p=0,007$).

Таким образом, более высокая частота встречаемости пациентов с циррозом печени была напрямую связана со сроком инфицирования ВГС.

Сопутствующие хронические заболевания имели в анамнезе все больные. Чаще всего в качестве сопутствующей патологии встречались заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКБ, калькулезный холецистит, хронический гастрит, хронический панкреатит).

Пять больных получали ПВТ первый раз в жизни, а 9 человек имели в анамнезе по одной неудачной попытке противовирусного лечения ХГС. Предыдущее лечение было представлено пегилированным интерфероном и рибавирином (схема ПВТ – 48 W) у всех. Чаще всего, пациенты достигали НВО в ходе терапии, однако в 44,4% случаев ($n=4$) в сроки от 1 до 6 месяцев развился рецидив. У 33,3% больных ($n=3$) ВО был не достигнут. Одному пациенту (11,1%) пришлось прервать курс ПВТ из-за возникших НЯ: депрессия, нарушение сна, субфебрилитет. У одного больного (11,2%) развился РВО, однако НВО достигнуть не удалось, так как возник вирусологический прорыв. Результаты проведенной ранее ПВТ с использованием пегилированных интерферонов представлены на рисунке 22.

Перед проведением ПВТ все пациенты проходили скрининговое обследование.

Все пациенты получали безинтерфероновый режим ПВТ, но разные комбинации ПППД.

Комбинацию даклатавира и асунапревира длительностью курса 24 недели получало 6 человек (42,8%), 8 человек (57,2%) принимали препарат паритапревир, омбитасвир, дасабувир, ритонавир либо в сочетании с рибавирином, либо без него с продолжительностью курса в 12 недель.

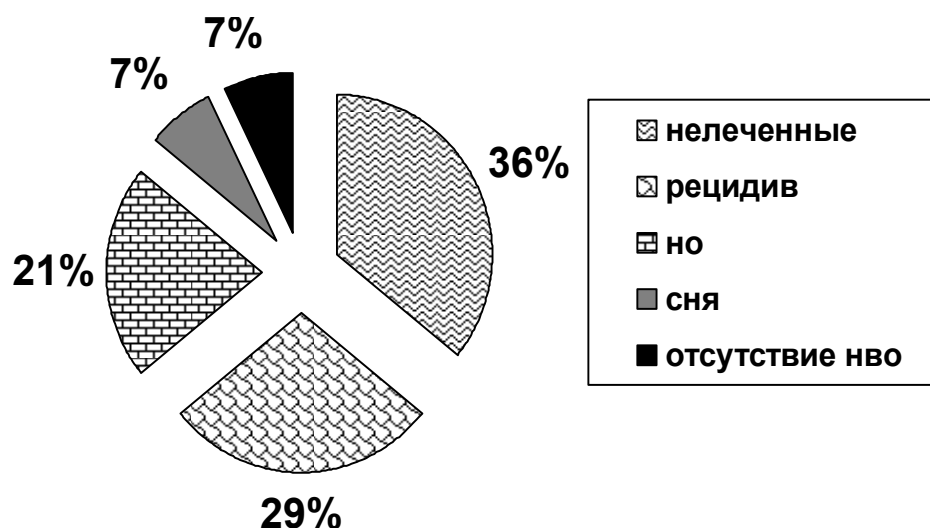


Рисунок 22 – Данные анамнеза пациентов, свидетельствующие о наличии или отсутствии полученной ранее ПВТ

У 13 пациентов (92,9%) был обнаружен ХГС (моноинфекция), а у одного пациента (7,1%) имел место, сопутствующий хронический гепатит В. Исследование показало, что у всех пациентов заболевание было вызвано ВГС 1-го генотипа: у 13 пациентов (92,9%) - 1b генотипом, а у одного пациента (7,1%) - 1a генотипом.

Уровень вирусной нагрузки перед началом ПВТ в безинтерфероновом режиме у всех пациентов был высокий и средний. Медиана ВН на старте терапии была $6,5 \cdot 10^5$ Ме/л, межквартильный размах составил $3,0 \cdot 10^5$ Ме/л - $1,1 \cdot 10^6$ Ме/л. Изменение вирусной нагрузки у пациентов в ходе лечения представлены на рисунке 23.

У всех пациентов (100%) был достигнут БВО и НВО к ее окончанию.

Таким образом, эффективность различных комбинаций ПППД примененных у пациентов в данном исследовании составила 100%.

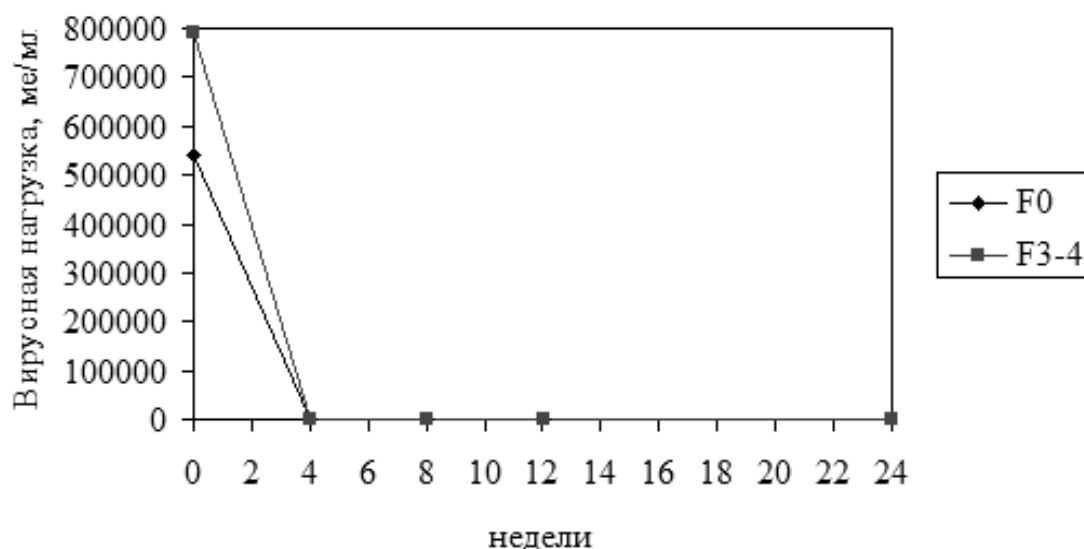


Рисунок 23 – Изменение ВН у пациентов с ХГС в ходе ПВТ в безинтерфероновом режиме

В результате данного исследования был проведен анализ состояния биохимических показателей в периферической крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) в ходе ПВТ в безинтерфероновом режиме. Характеристика биохимических показателей у данных пациентов представлена в таблице 15.

Перед началом ПВТ у 13 пациентов (92,9%) отмечалось повышение трансаминаз в периферической крови (менее 4 ВГН) и только у одного (7,1%) активность АлАТ достигала 9 ВГН. Медианы значений АлАТ и АсАТ составили 78,89 Ме/л (73,54 Ме/л-104,49 Ме/л) и 68,2 Ме/л (50,1 Ме/л-89,36 Ме/л) соответственно. В ходе статистической обработки полученных в результате исследования данных была выявлена прямая корреляционная зависимость между показателем АлАТ и значением ВН ($r = 0,74$; $p = 0,009$) и между показателями АлАТ и АсАТ ($r = 0,76$; $p = 0,006$).

Таким образом, повышение активности АлАТ и АсАТ являются иллюстрацией цитолитического синдрома, являющегося одним из основных патогенетических звеньев заболевания. А чем выше репликативная способность ВГС, тем более выражено цитопатическое действие вируса, а также аутоагрессии со стороны иммунной системы в отношении гепатоцитов.

Таблица 15 – Изменение биохимических показателей периферической крови у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) во время проведения ПВТ в безинтерфероновом режиме

Показатель	Нормальные значения	Срок ПВТ, недели					
		0 Ме (Q1-Q3)	2 Ме (Q1-Q3)	4 Ме (Q1-Q3)	8 Ме (Q1-Q3)	12 Ме (Q1-Q3)	24 Ме (Q1-Q3)
Общий билирубин Мкмоль/л	3,4 – 20,5	14,6 (10,9-21,1)	12,0 (9,9-21,4)	12,8 (10,4-6,1)	11,7 (8,7-19,1)	12,0 (7,7-17,0)	12,4 (10,8-14,5)
АлАТ, Ме/л	Менее 40	78,9 (73,5-104,5)	26,3 (16,6-31,9)	20,4 (12,2-29,3)	20,3 (13,2-21,3)	20,4 (16,4-20,9)	25,7 (24,4-31,9)
АсАТ, Ме/л	Менее 40	68,2 (50,1-89,4)	22,0 (18,8-31,9)	24,8 (18,0- 36,1)	23,5 (18,8-33,9)	26,2 (20,4-30,1)	17,8 (16,4-19,1)
ГГТП, Ед/л	Ж 5-36 М 8-61	69,8 (40,5- 117,8)	47,94 (25,0-64,3)	34,0 (19,5-52,9)	35,3 (29,0-43,3)	30,0 (16,0-33,1)	-
Щел.фосф, Мкмоль/л	Ж 0-240 М 0-270	81,1 (57,4- 128,5)	99,0 (94,0-142,0)	98,0 (82,3-135,0)	104,0 (88,0-157,4)	91,0 (80,8-120,3)	-

Примечание: Ме – медиана показателя. Q1-Q3 – межквартильный размах.

Для анализа изменения биохимических и иммунологических показателей все пациенты были разделены на группы по наличию или отсутствию фиброза печени.

I группа – пациенты без признаков фиброза печени (F0).

II группа – пациенты с выраженным фиброзом печени (F3- F4).

Для обеих групп пациентов была характерна нормализация активности цитолитических ферментов в ходе ПВТ уже ко второй неделе. Данные об изменении активности трансаминаз представлены на рисунках 24 и 25.

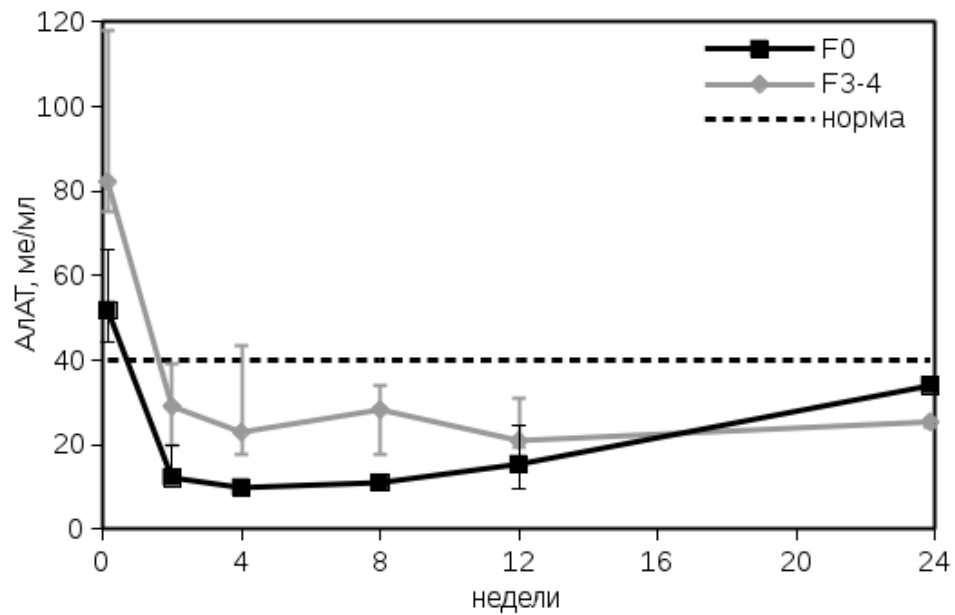


Рисунок 24 – Динамика изменения активности фермента АлАТ у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) двух групп (F0 и F3-4) на фоне ПВТ в безинтерфероновом режиме. На оси ординат показаны медианы активности АлАТ.

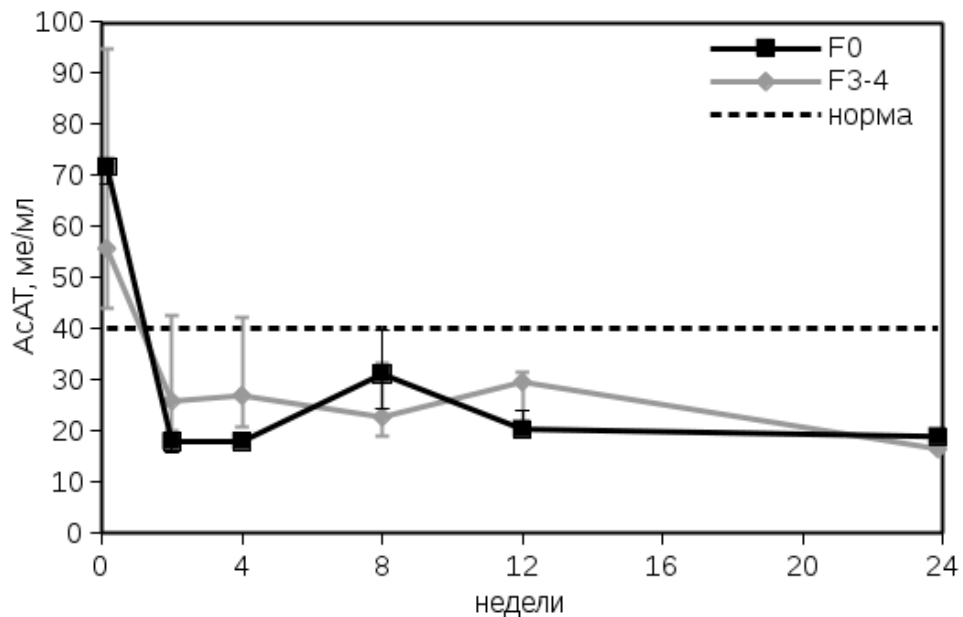


Рисунок 25 – Динамика изменения активности фермента АсАТ у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) двух групп (F0 и F3-4) на фоне ПВТ в безинтерфероновом режиме. На оси ординат показаны медианы активности АсАТ.

Показатели билирубина перед началом ПВТ были либо в пределах нормы, либо не превышали 3 ВГН. Медиана этого показателя составила $14,6 \pm 10,1$

мкмоль/л. Обнаруживалась прямая корреляционная связь между концентрацией билирубина и выраженностью фиброза печени ($r=0,53$; $p=0,04$). И обратная корреляционная зависимость между концентрацией билирубина и содержанием тромбоцитов в периферической крови пациентов ($r=-0,56$; $p=0,03$).

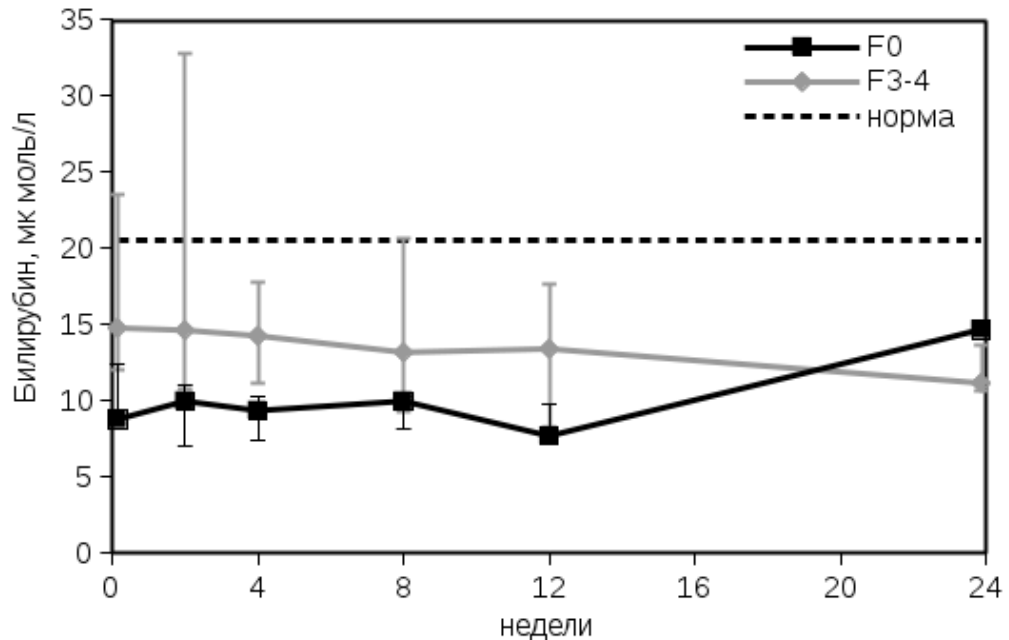


Рисунок 26 – Динамика изменения концентрации билирубина у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) двух групп (F0 и F3-4) на фоне ПВТ в безинтерфероновом режиме. На оси ординат показаны медианы концентрации билирубина.

Данные зависимости, возможно, объясняются сопутствующей патологией, возникающей у пациентов со стороны желчевыводящих путей (холецистит, холангит). Такая патология способствует нарушению выведения билирубина и его обратному всасыванию в кровоток. Чем дольше пациент страдает ХГС, тем чаще возникает прогрессия фиброза печени и чаще развиваются сопутствующие заболевания ЖВП, что приводит к повышению билирубина в периферической крови. Корреляционная связь концентрации билирубина и содержания тромбоцитов крови свидетельствует о том, что при более длительном сроке заболевания ХГС аутоиммунные механизмы приводят к угнетению кроветворения и приводят к стойкой тромбопении.

В ходе терапии у всех пациентов происходит нормализация уровня билирубина. На рисунке 26 представлены медианы концентрации билирубина в ходе ПВТ, из которого видно, что все значения не превышают уровня нормы.

Перед началом терапии у 43% женщин (6 человек) и у 8 мужчин (57%) наблюдалась повышенная активность фермента ГГТП, у женщин менее 3 ВГН, у мужчин менее 5ВГН. Медиана ГГТП у женщин была $58,76 \pm 12,63$ Ед/л, у мужчин $69,83 \pm 26,64$ Ед/л. Медиана ГГТП в группе пациентов с F0 оказалась в 3,27 раза меньше, чем в группе с F3-4. Наблюдалась прямая корреляционная зависимость между ГГТП и абсолютным содержанием нейтрофилов в крови ($r=0,59$; $p=0,02$)

В ходе ПВТ происходила нормализация ГГТП у всех пациентов. Динамика данного показателя представлена на рисунке 27.

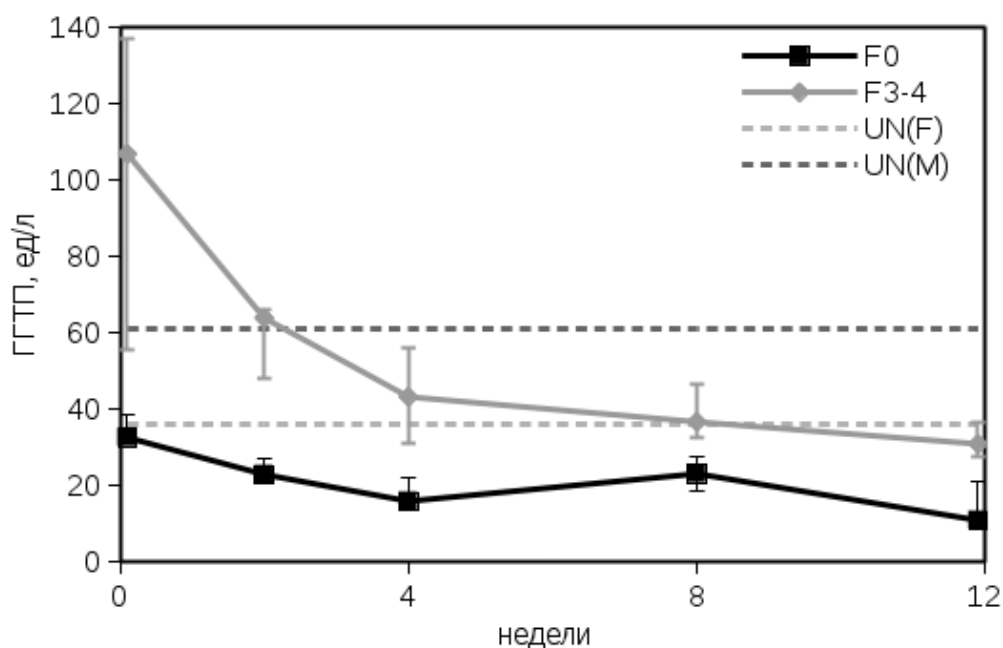


Рисунок 27 – Динамика изменения активности фермента ГГТП у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) двух групп (F0 и F3-4) на фоне ПВТ в безинтерфероновом режиме. На оси ординат показаны медианы активности ГГТП.

Таким образом, увеличение активности данного фермента на старте ПВТ, которое наблюдается в большей степени у мужчин и является проявлением цитолитического синдрома при ХГС, наиболее выражено у пациентов с более выраженным фиброзом печени.

Показатели щелочной фосфатазы в группе пациентов с F0 ($Me=113,51\pm 89,63$ мкмоль/л) были в 1,5 раз больше, чем в группе больных с F3-4. ($Me=75,4\pm 45,31$ мкмоль/л). Изменения этого показателя в ходе ПВТ представлены на рисунке 28.

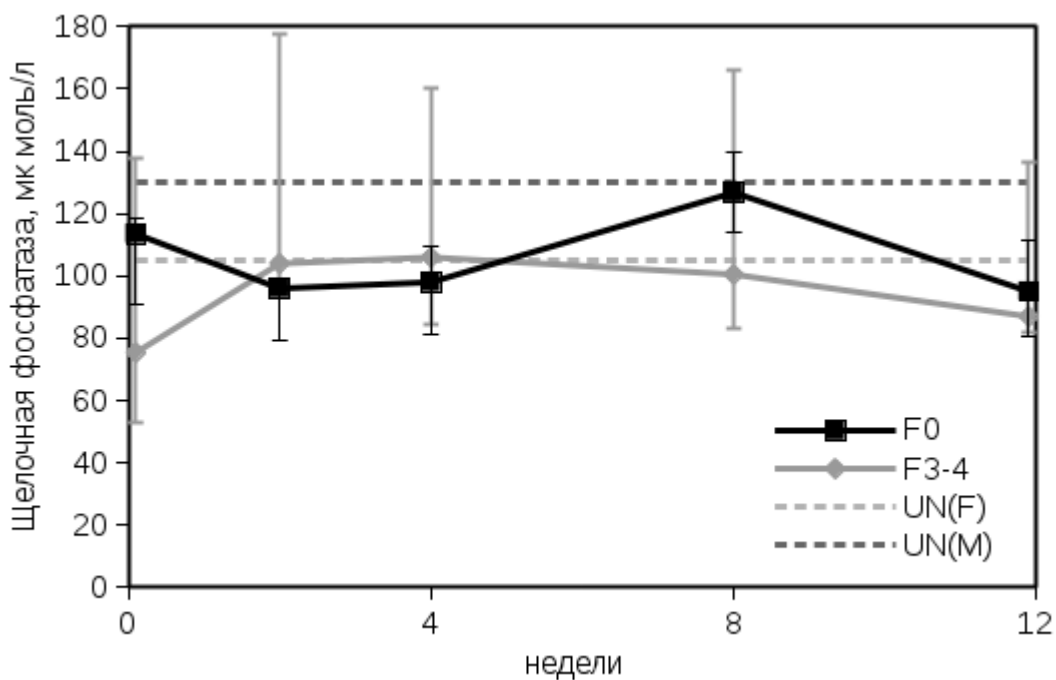


Рисунок 28 – Динамика изменения концентрации щелочной фосфатазы у пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) двух групп (F0 и F3-4) на фоне ПВТ в безинтерфероновом режиме. На оси ординат показаны медианы щелочной фосфатазы.

На рисунках 29 и 30 показаны изменения концентрации общего белка и альбумина в периферической крови пациентов в ходе ПВТ в безинтерфероновом режиме.

Если на старте терапии концентрация общего белка немного превышает нижнюю границу нормы у пациентов обеих групп, то к середине и окончанию ПВТ она возрастает (рисунок 29).

Концентрация альбумина оказалась в пределах нормы (рисунок 30).

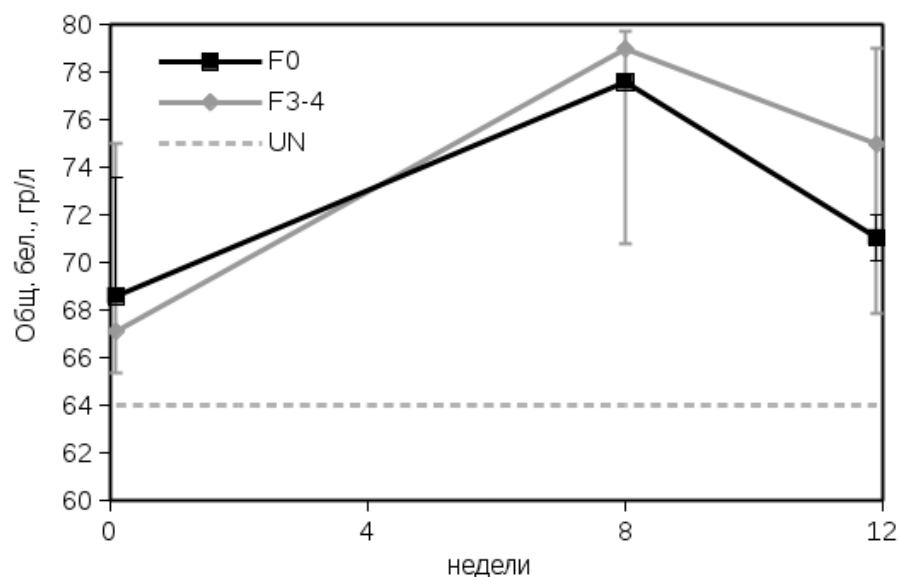


Рисунок 29 – Изменение концентрации общего белка в периферической крови больных ХГС (ВГС 1-го генотипа) в ходе ПВТ в безинтерфероновом режиме

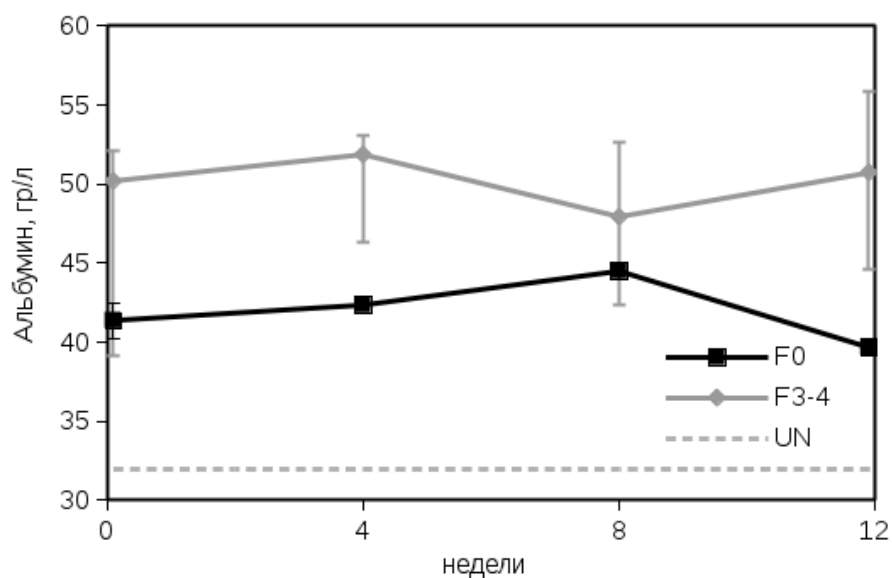


Рисунок 30 – Изменение концентрации альбумина в периферической крови больных ХГС (ВГС 1-го генотипа) в ходе ПВТ в безинтерфероновом режиме

5.2 Особенности содержания цитокинов/хемокинов в плазме крови пациентов во время ПВТ

Всем пациентам, получившим ПВТ с использованием безинтерферового режима, (14 человек) был проведен анализ содержания цитокинов/хемокинов

IFN α , IFN γ , TNF α , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC перед проведением, во время и по окончании терапии.

На основании наличия различных стадий фиброза печени у пациентов перед проведением ПБТ они были разделены на две группы:

I группа – пациенты без фиброза печени – F0 – 8 человек;

II группа – пациенты, с выраженным фиброзом (F3) и циррозом (F4) печени – 6 человек.

В результате проведенного анализа содержания цитокинов/хемокинов (TNF α , IFN α 2, IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC) были выявлены некоторые достоверно значимые изменения их концентраций в ходе ПБТ.

Изменение концентраций цитокинов/хемокинов у пациентов с отсутствием фиброза печени, получавших комбинацию ПППД до, во время и по окончании ПБТ представлены в таблице 16. В ней приведены медианы (Me), нижний и верхний квартили (Q1, Q3), а также достоверность (p) различия указанных концентраций в трех временных точках, полученная с использованием теста Фридмана.

Как видно из таблицы в группе пациентов с отсутствием фиброза печени к окончанию терапии было обнаружено достоверно значимое снижение концентрации хемокина CXCL10/IP-10 в сравнении с показателями на ее старте (p=0,025). Перед началом терапии медианы CXCL10/IP-10 в этой группе были выше таковых в группе условно здоровых лиц в 6,8 раз, а к окончанию терапии стали приближаться к показателям нормы. И уже в конце терапии медианы этого показателя в данной группе превышали таковые в группе условно здоровых лиц в 1,7 раз. Эти изменения представлены на рисунке 31.

Таблица 16 – Содержание цитокинов/хемокинов в плазме крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) без признаков фиброза печени на старте, во время и по завершении ПВТ с использованием комбинации ПППД

Цитокины/ Хемокины, пг/мл	Начало ПВТ			6/12 неделя ПВТ			Окончание ПВТ			P(F)
	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
TNF α	5,67	4,82	6,53	6,59	5,48	7,7	8,78	5,48	12,1	0,07
IFN α 2	69,8	61,1	78,6	63,4	28,4	98,4	32,1	3,19	61,1	0,61
IFN γ	3,39	2,31	4,48	4,11	1,03	7,2	3,19	3,19	3,19	0,99
CCL2/MCP-1	259,	192,7	325,6	223,5	183,9	263,2	436,7	221,7	651,7	0,68
CCL3/MIP-1 α	2,34	1,49	3,19	2,09	0,98	3,19	2,61	2,02	3,19	0,91
CCL8/MCP-2	18,6	14,2	23	16,5	13,4	19,7	17,8	14,2	21,4	0,07
CCL20/MIP3 α	11,7	5,22	18,1	30,5	9,03	52,0	9,31	7,47	11,1	0,99
CXCL9/MIG	1361	974	1748	1664	869,4	2459	1911	773,7	3048	0,99
CXCL10/IP-10	1139	785,6	1493	603	596,6	609,6	292	172,9	411,2	0,03
CXCL11/ITAC	146	48,8	243	74,3	49,7	98,95	189	160	218,5	0,75

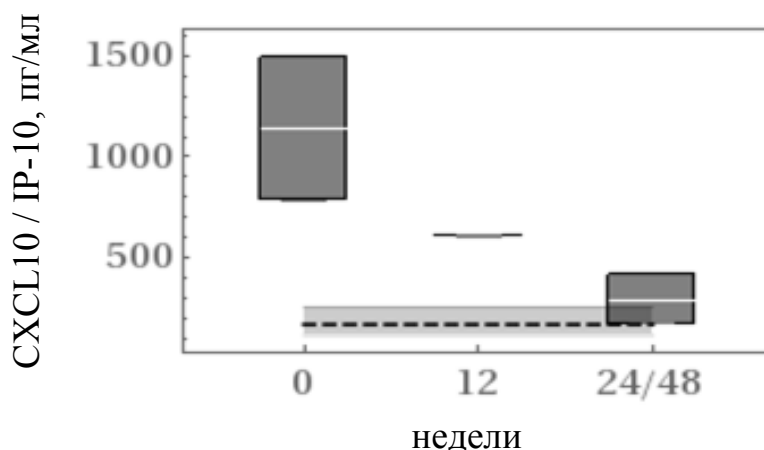


Рисунок 31 – Диаграммы размаха (box-and-wiskers) для концентрации хемокина CXCL10/IP-10 в ходе терапии в сравнении с контрольной группой у пациентов с отсутствием фиброза печени (светло-серым показана область, ограничивающая интерквартильный размах, а пунктир соответствует медиане для контрольной группы)

Таблица 17 – Содержание цитокинов/хемокинов в плазме крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) с выраженным фиброзом и циррозом печени на старте, во время и по завершении ПБТ с использованием ПППД

Цитокин/ Хемокины, пг/мл	Начало ПБТ			6/12 неделя ПБТ			Окончание ПБТ			Р (F)
	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
TNF α	12,73	11,1	14,8	10,9	9,26	13,37	11,7	8,8	16,87	0,55
IFN α 2	3,19	3,19	48,7	3,19	3,19	33,01	3,19	3,19	14,31	0,95
IFN γ	3,19	2,62	4,33	3,19	1,99	4,49	3,19	1,03	3,44	0,87
CCL2/MCP-1	400,4	366	495	407	379	536,8	380,1	355	614,6	0,85
CCL3/MIP-1 α	3,19	3,19	4,1	3,19	2,87	3,19	3,19	3,19	3,59	0,09
CCL8/MCP-2	20,84	19,4	41,1	26,4	21,8	38,07	33,19	26,6	46,89	0,34
CCL20/MIP3 α	25,22	13,6	47,8	25,2	8,07	60,27	19,12	11,8	30,94	0,80
CXCL9/MIG	1330	836	2384	676	486	1797	1513	960	2183	0,50
CXCL10/IP-10	1898	1588	3899	933	466	1425	615,8	452	1154	0,01
CXCL11/ITAC	269	147	386	176	93,0	237,6	199,9	138	252,9	0,49

Были измерены изменения концентраций цитокинов/хемокинов у второй группы пациентов до, во время и по окончании ПБТ, медианы (Me) и интерквартильный размах (Q1-Q3) для которых приведены в таблице 17. Для сравнения концентраций цитокинов/хемокинов в трех точках был использован тест Фридмана (достоверность p указана в последнем столбце таблицы).

В группе пациентов с выраженным фиброзом и циррозом печени также наблюдалось снижение концентрации хемокина CXCL10/IP-10 к завершению лечения ($p=0,00015$). На рисунке 37 представлены изменения концентрации CXCL10/IP-10 в ходе терапии. На старте ПБТ медиана данного хемокина в 11,4 раза превышала медиану в группе условно здоровых лиц. К окончанию лечения превышение снизилось до 3,7 раз.

Таким образом, среди рассмотренных показателей основным биомаркером, характеризующим снижение воспалительного процесса в печени в ходе ПБТ,

оказался хемокин CXCL10/IP-10. Снижение концентрации CXCL10/IP-10 не зависило от стадии фиброза печени.

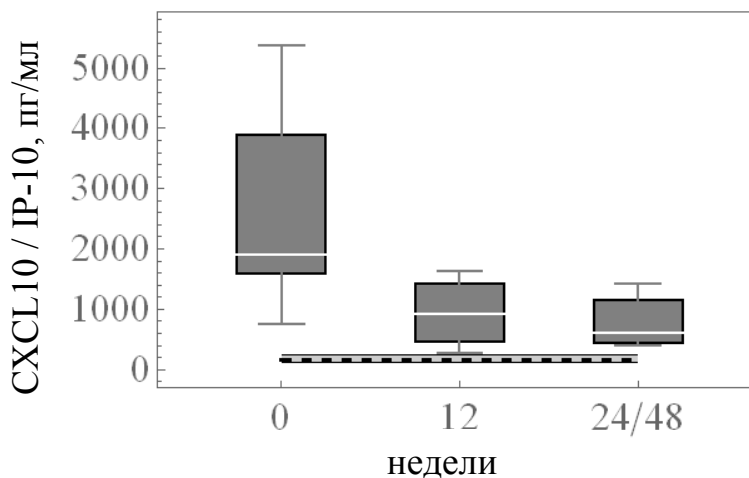


Рисунок 32 – Диаграммы размаха (box-and-wiskers) для концентрации хемокина CXCL10/IP-10 в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым)

5.3 Особенности содержания популяций лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3 и CCR6, в периферической крови пациентов во время ПБТ

На основании обнаружения различных стадий фиброза печени у пациентов перед проведением ПБТ они были разделены на две группы:

I группа – пациенты без фиброза печени (F0);

II группа – пациенты с выраженным фиброзом печени (F3 - F4).

С помощью проточной цитометрии были получены данные об изменениях содержания различных субпопуляций лимфоцитов в ходе ПБТ, что отображено в таблице 18.

В первой группе больных имела место некоторая тенденция к увеличению относительного содержания Т-лимфоцитов ($p=0,065$). Данные представлены на рисунке 33.

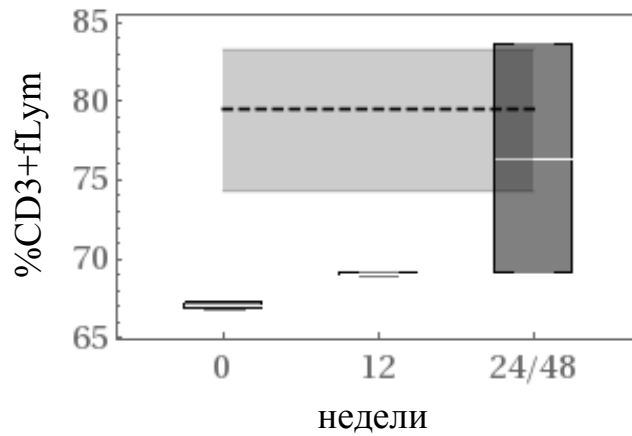


Рисунок 33 – Диаграммы размаха (box-and-wiskers) для относительного содержания Т-лимфоцитов в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым)

Таблица 18 – Содержание субпопуляций лимфоцитов в плазме крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) без признаков фиброза печени на старте, во время и по завершении ПВТ с использованием комбинации ПППД

Субпопуляции лимфоцитов		Начало ПВТ			6/12 неделя ПВТ			Окончание ПВТ			p(F)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
Лимфоциты	%	41,2	41,1	41,2	41,5	36,3	46,6	38,2	30,5	45,8	0,75
	$\times 10^9$	2,70	2,39	3	2,31	1,99	2,63	2,56	1,87	3,25	0,75
Т-лимфоциты	%	67	66,8	67,2	69	68,9	69,1	76,4	69,1	83,6	0,07
	$\times 10^9$	1,8	1,59	2,02	1,59	1,38	1,81	2,01	1,29	2,72	0,75
Т-хелперы	%	34,5	33,0	36,0	36,8	34,8	38,9	53,2	35,9	70,5	0,68
	$\times 10^9$	0,63	0,53	0,73	0,59	0,48	0,7	1,19	0,46	1,92	0,75
CXCR3+ Т-лимфоциты	%	45,7	35,5	55,9	32,3	23	41,5	29,3	23,3	35,2	0,75
	$\times 10^9$	0,8	0,72	0,89	0,53	0,32	0,75	0,63	0,3	0,96	1
CCR6+ Т-лимфоциты	%	24,8	18,6	31	21,8	15,6	27,9	30,0	15,9	44	0,75
	$\times 10^9$	0,46	0,29	0,62	0,36	0,21	0,51	0,7	0,21	1,19	0,92
CXCR3+ Т-хелперы	%	49,8	41,8	57,7	45,3	43,9	46,6	42,9	39,2	46,5	0,75
	$\times 10^9$	0,3	0,3	0,3	0,27	0,22	0,31	0,48	0,22	0,75	1
CCR6+ Т-хелперы	%	33,5	33,4	33,6	29,4	28,6	30,1	34,3	28,4	40,2	0,75
	$\times 10^9$	0,21	0,18	0,24	0,17	0,14	0,21	0,45	0,13	0,77	0,75

Продолжение таблицы 18

Субпопуляции лимфоцитов		Начало ПБТ			6/12 неделя ПБТ			Окончание ПБТ			p(F)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
CTL	%	28,7	26,5	31,0	27,8	23,9	31,7	25,4	19,0	31,7	0,93
	$\times 10^9$	0,52	0,49	0,54	0,43	0,43	0,44	0,46	0,41	0,52	0,25
CXCR3+ CTL	%	51,2	34,8	67,6	47,2	43,6	50,7	48,6	46,5	50,7	0,93
	$\times 10^9$	0,26	0,19	0,33	0,21	0,19	0,22	0,22	0,21	0,24	1
CCR6+ CTL	%	8,35	2,4	14,3	7,1	3	11,2	10,3	3	17,5	0,5
	$\times 10^9$	0,04	0,01	0,08	0,03	0,01	0,05	0,05	0,01	0,09	0,75
В-лимфоциты	%	11,4	10	12,7	10,6	8,3	12,8	9	8,6	9,4	0,75
	$\times 10^9$	0,21	0,16	0,26	0,17	0,11	0,23	0,18	0,11	0,26	0,25
CXCR3+ В-лимфоциты	%	47,8	33,4	62,1	43,6	29,8	57,3	33,5	14,4	52,5	0,68
	$\times 10^9$	0,09	0,09	0,1	0,07	0,07	0,07	0,05	0,04	0,06	0,03
CCR6+ В-лимфоциты	%	97,3	95,8	98,7	97,9	97,8	98	99,1	98,5	99,7	0,25
	$\times 10^9$	0,2	0,15	0,25	0,17	0,11	0,23	0,18	0,11	0,25	0,75
NK-клетки	%	22	20,1	23,9	20,1	18,6	21,5	12,8	4,9	20,7	0,68
	$\times 10^9$	0,39	0,38	0,41	0,32	0,29	0,34	0,2	0,13	0,27	0,03
CXCR3+ NK-клетки	%	9,5	7,1	11,9	12,2	10,9	13,4	11,3	9,1	13,4	0,07
	$\times 10^9$	0,04	0,03	0,05	0,04	0,04	0,04	0,02	0,01	0,04	0,25
CCR6+ NK-клетки	%	1,6	1	2,2	1,95	1,6	2,3	9,55	1,6	17,5	0,07
	$\times 10^9$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,75
NKT-клетки	%	0,4	0,2	0,6	2	0,1	3,9	4,35	4,2	4,5	0,25
	$\times 10^9$	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,05	0,09	0,05	0,12	0,25
CXCR3+ NKT-клетки	%	36,5	26,4	46,5	37,5	34,8	40,2	36,2	32,1	40,2	0,93
	$\times 10^9$	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02	0,04	0,25
CCR6+ NKT-клетки	%	28,4	10,2	46,6	28,1	18,8	37,4	32,05	18,8	45,3	0,93
	$\times 10^9$	0,001	0,001	0,002	0,005	0,001	0,01	0,033	0,01	0,055	0,25

Также были рассмотрены и проанализированы данные по содержанию различных субпопуляций лимфоцитов в ходе ПБТ у пациентов с выраженным фиброзом и циррозом печени. Данные представлены в таблице 19.

Как видно из таблицы было обнаружено достоверное увеличение относительного содержания CCR6+ NKT ($p=0,02$) в ходе терапии. Перед проведением ПБТ этот показатель был в 10 раз меньше нормы, а к окончанию лечения различие сократилось до 5 раз. Изменения представлены на рисунке 34.

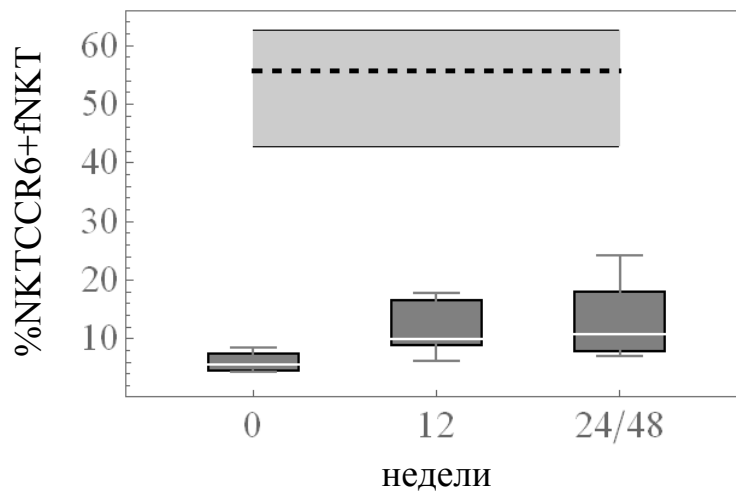


Рисунок 34 – Диаграммы размаха (box-and-wiskers) для NKT-клеток с CCR6 рецептором в динамике терапии в сравнении с группой условно здоровых лиц (медиана и интерквартильный размах для нее показаны пунктиром и областью, закрашенной светло-серым)

Таким образом, наблюдалось повышение содержания CCR6+ NKT клеток у пациентов с выраженным фиброзом печени и тенденция к повышению относительного содержания Т-лимфоцитов, что возможно объясняется основной ролью этих клеток в борьбе с ВГС.

Таблица 19 – Содержание субпопуляций лимфоцитов в плазме крови пациентов с ХГС (ВГС 1-го генотипа) с выраженным фиброзом и циррозом печени на старте, во время и по завершении ПВТ с использованием ПППД

Субпопуляции лимфоцитов		Начало ПВТ			6/12 неделя ПВТ			Окончание ПВТ			p(F)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
Лимфоциты	%	47,4	39,4	50,05	35,2	33,8	46,95	39,3	31,83	40,28	0,65
	10 ⁹	2,37	1,48	3,49	1,36	1,04	2,94	1,65	1,36	2,77	0,61
Т-лимфоциты	%	72,5	63,55	78,05	62,8	61,15	72,73	73,2	63,15	78,3	0,75
	10 ⁹	1,7	1,14	2,18	0,79	0,68	2,08	1,22	0,86	1,89	0,51
Т-хелперы	%	42,61	34,39	51,42	46,64	39,1	51,81	45,12	36,83	48,68	0,77
	10 ⁹	0,64	0,48	0,89	0,73	0,41	1,12	0,58	0,44	0,81	0,89
CXCR3+ Т-лимфоциты	%	43,15	30,35	46,1	51,7	16,85	57,65	24,1	22,38	43,15	0,83
	10 ⁹	0,74	0,38	1,01	0,38	0,19	0,41	0,38	0,24	0,43	0,59
CCR6+ Т-лимфоциты	%	17,9	13,6	20,65	19	15,9	32,7	18,1	14,98	22	0,69
	10 ⁹	0,27	0,15	0,45	0,23	0,15	0,33	0,22	0,13	0,34	0,88
CXCR3+ Т-хелперы	%	45,45	36,50	53,65	55,80	31,58	62,15	35,70	33,08	44,75	0,65
	10 ⁹	0,34	0,22	0,39	0,25	0,13	0,47	0,19	0,16	0,26	0,63
CCR6+ Т-хелперы	%	23,7	21,5	25,65	25,8	19,73	44,58	25,1	22,2	28,45	0,79
	10 ⁹	0,16	0,1	0,23	0,16	0,08	0,23	0,15	0,09	0,19	0,83
CTL	%	17,9	15,9	24,9	19,3	16,2	26,4	23,1	18,7	28,2	0,73
	10 ⁹	0,35	0,24	0,4	0,35	0,25	0,42	0,33	0,26	0,39	0,98
CXCR3+CTL	%	59,5	48,8	65,7	31,1	21,6	59,8	33,5	19,5	48,9	0,15
	10 ⁹	0,2	0,14	0,23	0,15	0,07	0,29	0,12	0,09	0,15	0,55
CCR6+ CTL	%	2,55	2,05	4,25	5,6	4,13	6,23	6,6	4,53	7,45	0,13
	10 ⁹	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,17
В-лимфоциты	%	10,35	7,3	20,35	11,7	6,93	15,55	6,9	4,28	12,1	0,42
	10 ⁹	0,18	0,09	0,46	0,09	0,07	0,24	0,08	0,05	0,17	0,61
CXCR3+В-лимфоциты	%	20,75	12	23,45	5,8	4,13	15,75	17	7,73	22,05	0,32
	10 ⁹	0,03	0,02	0,05	0,007	0,004	0,03	0,008	0,005	0,03	0,3
CCR6+В-лимфоциты	%	97,9	97,25	98,55	98,2	97,88	98,88	98,2	97,5	98,5	0,85
	10 ⁹	0,18	0,08	0,45	0,09	0,07	0,24	0,08	0,04	0,17	0,6
NK-клетки	%	15,65	11,55	17,45	16,9	12,35	20,63	20,8	14,45	23,23	0,46
	10 ⁹	0,29	0,16	0,34	0,21	0,09	0,36	0,19	0,18	0,33	0,89

Продолжение таблицы 19

Субпопуляции лимфоцитов		Начало ПБТ			6/12 неделя ПБТ			Окончание ПБТ			p(F)
		Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	
CXCR3+NK-клетки	%	12,7	9,35	16,35	11,8	4,55	16,9	10,6	5,4	13,55	0,72
	10 ⁹	0,04	0,02	0,05	0,02	0,006	0,06	0,02	0,01	0,03	0,77
CCR6+ NK-клетки	%	1,6	0,7	3,05	2,5	1,4	3,75	3,9	2,43	4,95	0,21
	10 ⁹	0,002	0,002	0,006	0,006	0,002	0,009	0,007	0,005	0,009	0,29
NKT-клетки	%	5	0,6	12,35	3,6	1,4	7,23	6,9	2,38	13,18	0,63
	10 ⁹	0,08	0,01	0,17	0,09	0,009	0,11	0,13	0,03	0,17	0,37
CXCR3+ NKT-клетки	%	14,9	7,25	19,65	26,6	7,28	31,03	10,8	5,53	16,75	0,38
	10 ⁹	0,003	0,002	0,02	0,005	0,003	0,018	0,014	0,003	0,016	0,81
CCR6+ NKT-клетки	%	5,55	4,6	7,4	9,9	8,85	16,48	10,7	7,95	17,95	0,02
	10 ⁹	0,005	0,001	0,01	0,008	0,001	0,009	0,011	0,005	0,02	0,3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активность эпидемического процесса гепатита С поддерживается за счет заболеваемости хроническими формами при медленных темпах снижения. В 2018 году заболеваемость ХГС на территории РФ в среднем составила 32,72 на 100 тыс. населения, снизившись на 20% по сравнению с предыдущим годом. Однако по данным Роспотребнадзора с начала регистрации (1999 г.) до 2018 года его доля в общей структуре хронических вирусных гепатитов возросла с 54,8 % до 77,6 %. Кроме того, ежегодно возрастает и кумулятивное число случаев.

С учетом рекомендаций ВОЗ [5] вопрос о снижении заболеваемости ХГС в настоящее время является актуальным как для глобального здравоохранения, так и российского. ГС в отличие от ГВ является инфекцией, не управляемой методами специфической профилактики [152]. Следовательно, достигнуть значимого снижения заболеваемости возможно только посредством проведения этиотропной терапии, которая в данном случае признается необходимой профилактической мерой, ведущей к сокращению источников ВГС.

В настоящее время утвержденным и внедренным стандартом терапии больных ХГС является использование пегилированного интерферона (PEG-IFN) и рибавирина (RBV). Это рекомендовано национальными и мировыми протоколами [20,64,66].

Эффективность данной терапии составляет от 40 до 80% и может быть повышена за счет индивидуального подхода к назначению ПВТ, своевременной профилактики и купирования нежелательных явлений, а также за счет использования новых стратегий ПВТ [93,105,110], использование которых также может сократить сроки лечения.

Наиболее часто у практических врачей возникает вопрос оптимального выбора схем ПВТ, поскольку приходится учитывать как экономические аспекты, так и эффективность и безопасность лечения. Поэтому прогноз эффективности терапии с использованием интерферона остается и сейчас очень важным.

С этой целью в работе было проведено изучение клинико-иммунологических особенностей на старте терапии, которое дало возможность выделить предиктор эффективности лечения.

Исследование проведено в период с 2015 по 2017 гг. на кафедре инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, СПбГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина» и ФБУН «Научно-исследовательский институт 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 в рамках дневного стационара, которое включало сбор жалоб, анамнеза заболевания и жизни пациента, эпидемиологического анамнеза, физикальный осмотр по системам и органам, проведение клинического, биохимического анализа крови, определение в периферической крови маркеров вирусных гепатитов, молекулярно-биологическое исследование ВГС с определением генотипа, содержания РНК ВГС, инструментальное обследование (УЗИ щитовидной железы, органов брюшной полости и забрюшинного пространства, транзиторная ультрозвуковая эластометрия печени, ФГДС).

У 86 пациентов и 26 условно здоровых лиц было проведено определение содержания цитокинов ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$) и хемокинов ($CCL20/MIP-3\alpha$, $CXCL9/MIG$, $CXCL11/ITAC$) в плазме крови методом мультиплексного анализа. Содержание основных субпопуляций лимфоцитов определялось методом проточной цитометрии. Были измерены содержания Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток, НКТ-клеток и экспрессия этими клетками хемокиновых рецепторов CCR6 и CXCR3.

Статистическая обработка полученных результатов проведена 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. Для определения степени корреляции клинических, лабораторных, иммунологических показателей использовали двухсторонний ранговый корреляционный анализ Спирмена.

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

В ходе исследования было установлено, что у 44% пациентов в момент обращения жалобы отсутствовали, что подтверждает бессимптомность ХГС. Выявлена связь между возрастом пациентов и сроком их инфицирования, степенью гепатомегалии. У всех пациентов отсутствовали выраженные проявления экскреторно-билиарного и холестатического синдромов, но у 16,3% выявлены признаки субклинически протекающего процесса поражения печени (субиктеричность склер).

При исследовании биохимических показателей было выявлено, что у всех пациентов присутствовали лабораторные признаки минимальной биохимической активности процесса. Ведущими синдромами были цитолитический и экскреторно-билиарный. Как проявление цитолитического синдрома у всех пациентов наблюдалось умеренное повышение активности АлАТ, АсАТ, ГГТП. Лабораторные проявления экскреторно-билиарного синдрома наблюдались в 13% случаев. У 18,7% пациентов были выявлены проявления геморрагического синдрома в виде снижения ПТИ. В 7,7% случаев обнаружено снижение общего белка и альбумина крови, что указывает на нарушение белково-синтетической функции печени и является следствием длительного течения ХГС и выраженного фиброза.

Изменения в гемограмме были следующими: анемия у 7,3%, тромбоцитопения у 20,3%, лейкоцитоз у 9,8% и лейкопения у 5,7%. Молекулярно-биологическая характеристика ВГС позволила выявить наиболее часто

встречающиеся генотипы вируса –1b и 3a, что согласуется с данными по РФ [17]. Распределение пациентов по уровню ВН обнаружило: 47% - высокий, 22% - средний и 31% - низкий уровни.

Изучение признаков фиброза печени показало, что у 45 пациентов (36,6%) обнаруживалось отсутствие фиброза печени (F0), а у 78 пациентов (63,4%) - различные стадии фиброза (F1- F4).

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

Большая продолжительность заболевания сопряжена с большей возможностью формирования фиброза печени, что сочетается с увеличением печени, обнаруживаемой при пальпаторном исследовании брюшной полости и изменением ее эластичности и плотности. Взаимосвязь активности трансаминаз и фиброза печени указывает на активацию Т-клеточного звена иммунитета в ответ на действие вируса, в результате которого происходит апоптоз пораженного гепатоцита и высвобождение в кровеносное русло цитолитических ферментов [11,12,15,25,33].

В ходе иммунологического обследования пациентов обнаружено, что концентрация цитокинов/хемокинов: $\text{TNF}\alpha$, $\text{CCL20/MIP-3}\alpha$, CXCL9/MIG , CXCL11/ITAC – у пациентов с ХГС в разы (в 1,9; 1,6; 3,2 и 2,8 раза) превышает концентрации тех же показателей в группе условно здоровых лиц с достоверностью $p=0,0001$, $p=0,0002$, $p<0,0001$, $p<0,0001$ соответственно. Обнаружены корреляционные связи между $\text{TNF}\alpha$ и CXCL9/MIG ($r=0,397$; $p<0,001$), $\text{TNF}\alpha$ и CXCL11/ITAC ($r=0,491$; $p<0,0001$), CXCL9/MIG и CXCL11/ITAC ($r=0,515$; $p<0,0001$), а также $\text{CCL20/MIP-3}\alpha$ и CXCL11/ITAC ($r=0,431$; $p<0,005$). Между $\text{IFN}\gamma$ и $\text{TNF}\alpha$ ($r=0,278$; $p<0,005$), $\text{IFN}\gamma$ и $\text{CCL20/MIP-3}\alpha$ ($r=0,272$; $p<0,005$), а также между $\text{CCL20/MIP-3}\alpha$ и CXCL9/MIG ($r=0,218$; $p<0,005$) были обнаружены слабые корреляции при высокой достоверности.

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

Также была рассмотрена корреляционная зависимость между концентрацией цитокинов/хемокинов и стадией заболевания. В результате анализа установлено наличие слабых прямых взаимосвязей между хемокином CXCL9/MIG и стадией заболевания ($r=0,253$; $p=0,02$). Имеется тенденция к увеличению CCL20/MIP-3 α ($r=0,206$; $p=0,06$), а также TNF α ($r=0,207$; $p=0,056$) при увеличении стадии фиброза печени.

При исследовании взаимосвязей между концентрацией цитокинов/хемокинов и клинико-биохимическими показателями наблюдалась слабая связь между возрастом пациентов и содержанием хемокина CXCL9/MIG ($r=0,282$; $p<0,05$), между степенью увеличения печени и концентрацией хемокина CCL20/MIP-3 α ($r=0,221$; $p<0,05$). По всей видимости, с возрастом увеличивался срок инфицирования, увеличивалась стадия выраженности фибротических изменений в печени и активировался процесс специфического Т-клеточного иммунного ответа. Увеличение в периферической крови IFN γ и TNF α коррелировало со снижением содержания тромбоцитов ($r=-0,274$; $p<0,05$ и $r=-0,313$; $p<0,05$). Цитокины IFN γ и TNF α являются маркерами хронического воспалительного процесса, в том числе и при ХГС. У пациентов с длительным течением заболевания развивается аутоиммунная реакция по отношению к тромбоцитам, что приводит к снижению их концентрации.

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

В ходе анализа содержания субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CXCR3 и CCR6, в периферической крови больных было проведено сравнение с группой условно здоровых лиц. У пациентов с ХГС медиана содержания Т-хелперов не отличается от медианных значений у условно здоровых лиц, а значения цитотоксических Т-лимфоцитов было в три раза выше. Увеличение содержания CTL свидетельствует об активации Т-киллерного звена

иммунитета в ответ на репликацию вируса. Также содержание НК-клеток у больных с ХГС в 1,6 раза больше, чем у условно здоровых лиц.

Такое распределение лимфоцитов у пациентов с ХГС с увеличением процентного содержания клеток, обладающих цитотоксической активностью, (CTL и НК-клеток) объясняется активацией эффекторного звена иммунитета и является ответной иммунной реакцией организма на внедрение вируса.

У пациентов с ХГС определялись более низкие показатели Th, CTL, НК-клеток, NKT-клеток, экспрессирующих на своей поверхности CXCR3. Содержание Th-лимфоцитов с CXCR3 у пациентов с ХГС было в 1,3 раза меньше ($p=0,003$), чем у условно здоровых лиц. По сравнению с контрольной группой 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 NKT-клеток с CXCR3 в 2,7 раза меньше ($p<0,0001$).

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

Относительное содержание Th-лимфоцитов, CTL, NKT-клеток, экспрессирующих на своей поверхности CCR6 хемокиновый рецептор, было значительно меньше данных показателей в контрольной группе: Th - в 2 раза ($p<0,0001$), CTL - в 1,5 раза ($p=0,052$) и NKT-клеток - в 3 раза ($p<0,0001$).

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

Для выделения предиктора эффективности ПВТ исследовалась группа пациентов ($n=41$) с ХГС (ВГС 1-го генотипа). В данной группе проведено исследование клинических, биохимических и иммунологических показателей не только на старте, но и в динамике терапии. У всех пациентов, получавших

терапию с включением PEG-IFN в сочетании как с рибавирином, так и с ингибитором NS3-4A сериновой протеазы, определен высокий уровень ВН.

87,8% пациентов развили, а 12,2% не развили непосредственного вирусологического ответа. У 31 пациента, ответившего на терапию, был достигнут БВО, а у 36 - РВО.

У пациентов в процессе лечения происходила нормализация активности ферментов цитолиза (АлАТ, АсАТ, ГГТП) в те же сроки, что и снижение ВН, до неопределяемого уровня РНК ВГС.

Исследования, проведенные перед началом ПВТ, выявили достоверные корреляционные зависимости между уровнями хемокинов и цитокинов воспаления. Далее, всех пациентов, достигших НВО, разделили на две группы: I группу – с отсутствием признаков фиброза печени – и II группу – с наличием фиброза. В ходе терапии исследовались в периферической крови концентрации цитокинов/хемокинов $TNF\alpha$, $IFN2\alpha$, $IFN\gamma$, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC.

У пациентов I группы в процессе лечения снижалась концентрация хемокина CXCL11/I-TAC, являющегося лигандом CXCR3 рецептора, что свидетельствует о том, что в ходе эрадикации ВГС прекращается активное высвобождение хемокинов пораженными клетками. Выявлено достоверное повышение концентрации $TNF\alpha$ с максимальными показателями к окончанию терапии.

У пациентов II группы обнаружено достоверное увеличение уровня хемокина CCL2/MCP-1 с наибольшим нарастанием показателя к середине лечения и с последующим снижением. Вероятно, это связано с тем, что после эрадикации ВГС из гепатоцитов к 4-12 неделе лечения (сроки негативации PCR HCV в периферической крови) постепенно прекращается высвобождение этого хемокина из клеток.

При исследовании субпопуляций лимфоцитов в ходе терапии оказалось, что у больных I группы происходило увеличение содержания клеток, обладающих способностью к цитотоксической активности: CTL и NK-клетки,

экспрессирующие CXCR3. В то же время уровень В-лимфоцитов, экспрессирующих CXCR3, снижался. Под воздействием экзогенного интерферона, который входит в оба варианта схем терапии, происходило увеличение активности Т-клеточного цитотоксического звена иммунитета, ответственного за эрадикацию ВГС из организма путем запуска апоптоза пораженных вирусом гепатоцитов.

У пациентов II группы также обнаруживалось увеличение содержания цитотоксических клеток, но за счет НК и НКТ-клеток, что свидетельствует об активации клеток врожденного противовирусного 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 интерферона такой маркер был идентифицирован. Им оказался хемокин CCL20/MIP-3 α , уровень которого на старте ПВТ был в 4 раза выше, чем у пациентов, ответивших на лечение и условно здоровых лиц. Кроме того, обнаружена некоторая тенденция к повышению концентрации TNF α на старте ПВТ в группе не ответивших на ПВТ.

В ходе проведенного ROC-анализа были построены ROC-кривые и определены ППК, что дало возможность построения «дерева решения», позволяющего разделить пациентов на группы ответивших и не ответивших на ПВТ перед ее началом. Проведенный анализ показал, что среди исследованных цитокинов/хемокинов наиболее информативными оказались CCL20/MIP-3 α и TNF α . Площадь под ROC-кривой была равна 0,86 для CCL20/MIP-3 α и 0,73 для TNF α . Построение «дерева решения» с использованием CCL20/MIP-3 α показало, что достижение НВО наиболее вероятно при содержании этого хемокина ниже 25 пг/мл. Чувствительность и специфичность метода оказались равными 91% и 80% соответственно. Если, кроме CCL20/MIP-3 α , использовать данные по TNF α , то можно более точно определить принадлежность пациентов к группе ответивших на ПВТ. Был разработан алгоритм подбора эффективной ПВТ, представленный на рисунке 35.

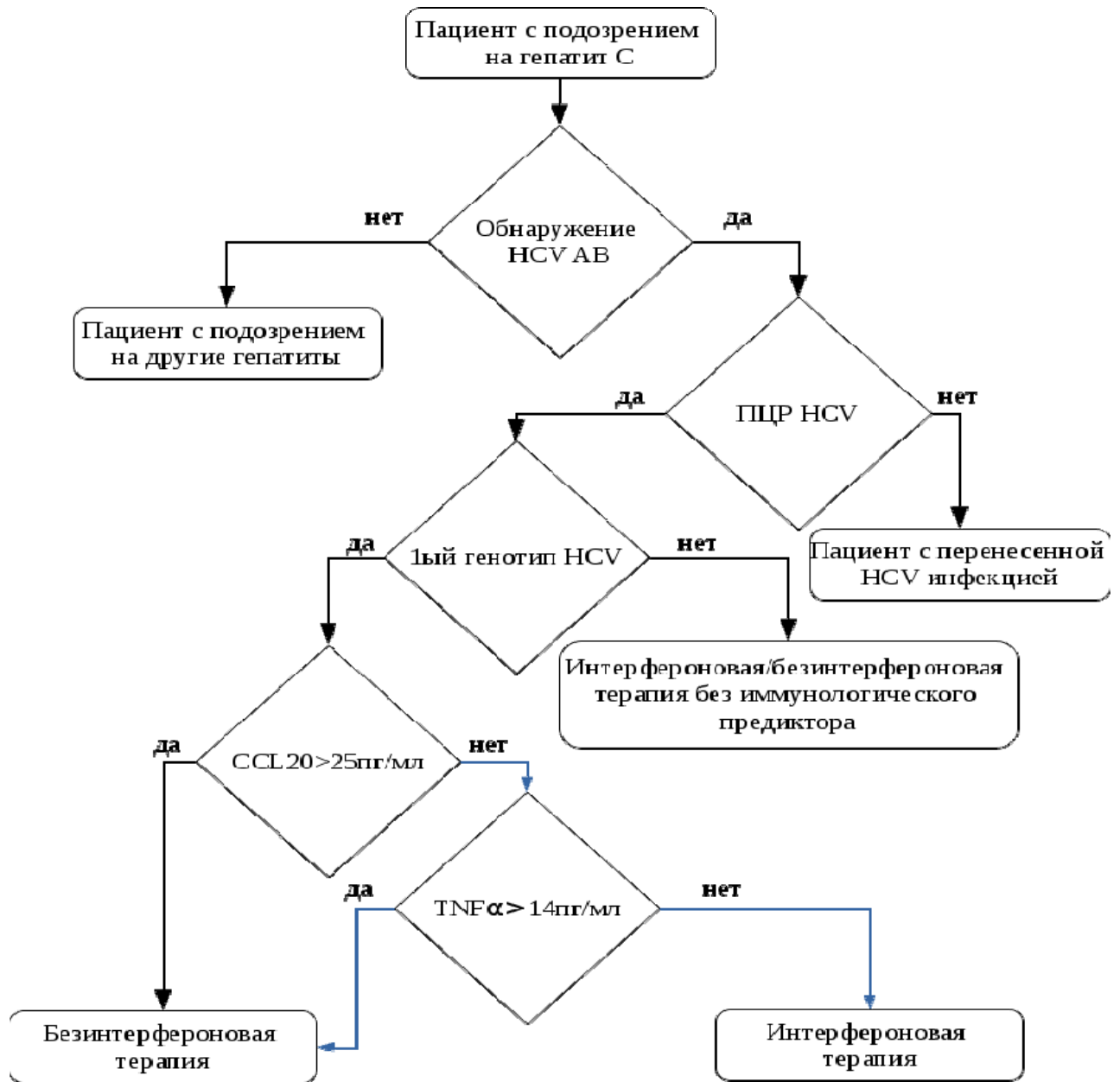


Рисунок 35 – Алгоритм подбора эффективной противовирусной терапии пациентов с ХГС

Внедрение программ иммунологического скрининга у пациентов с ХГС, инфицированных вирусом 1 генотипа, перед проведением ПВТ позволит наиболее эффективно подобрать схему терапии.

Заключительным этапом исследования явилось изучение изменения клинико-лабораторных и иммунологических показателей у пациентов с ХГС в динамике проведения ПВТ с использованием ПППД (n=14). Средний возраст

составил $48,2 \pm 13,6$ лет. В исследуемой группе эффективность терапии составила 100%, поэтому оказалось невозможным выделить предикторы эффективности терапии.

Были исследованы изменения концентрации некоторых цитокинов/хемокинов в динамике ПБТ. Пациенты были разделены на две группы по наличию фибротических изменений в ткани печени. По результатам анализа данных эластографии печени к I группе отнесли 78,6% больных ($n=11$), у которых определялся выраженный фиброз (F3) и цирроз печени (F4). Ко II группе были отнесены три пациента (21,4%) без фибротических изменений.

Во время терапии у пациентов обеих групп негативация PCR HCV в периферической крови происходила уже ко 2-й неделе проводимой терапии, также к этому сроку происходила нормализация активности цитолитических ферментов (АлАТ, АсАТ, ГГТП). Корреляционная зависимость между уровнем ВН и активностью АлАТ, обнаруженная во время исследования, характеризует цитолитический синдром и цитопатическое действие ВГС на гепатоциты.

Всем пациентам, получившим ПБТ с использованием ПППД, был проведен анализ содержания цитокинов/хемокинов $IFN2\alpha$, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC перед проведением терапии и в динамике.

У пациентов I группы в ходе ПБТ произошло снижение концентрации хемокина CXCL10/IP-10 ($p=0,025$). Причем, если концентрация этого хемокина на старте ПБТ была в 6,8 раза выше показателей контрольной группы, то к окончанию она превышала концентрацию в группе условно здоровых лиц лишь в 1,7 раза.

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

Таким образом, снижение уровня сывороточного хемокина CXCL10/IP-10, не зависящего от стадии фиброза печени во время проведения 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 NKT CCR6+-клеток у пациентов с F3-4, что, вероятно, подтверждает роль этих клеток в эрадикации ВГС.

ВЫВОДЫ

1. В ходе клинико-иммунологического обследования пациентов с ХГС выявлено повышение концентраций цитокинов/хемокинов (TNF α , CCL20/MIP-3 α , CXCL/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 α , 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, обнаружено 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+ NKT клеток.
4. Прогностическими биомаркерами эффективности ПВТ с использованием интерферонов являются цитокины/хемокины CCL20/MIP-3 α и TNF α , 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 безинтероновой схемы основным биомаркером, характеризующим снижение воспалительного процесса в печени, является хемокин CXCL10/IP-10, снижение концентрации которого в динамике терапии не зависило 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 для пациентов с ХГС (ВГС 3а и 2-го генотипов), встречающихся 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астанина, Н.С. Хронический гепатит С: прогноз эффективности противовирусной терапии / Н.С. Астанина, Т.П. Оспельникова, О.И. Киселев, Е.В. Эсауленко, Ф.И. Ершов // Цитокины и воспаление. –2012. – Т. 11. – №1. – С. 119-122.
2. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 10-й выпуск. Под редакцией В.И. Покровского, А.А. Тотоляна. – СПб: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2016. – 152с.
3. Всемирная Организация Здравоохранения. Новые рекомендации ВОЗ по скринингу, оказанию медицинской помощи и лечению лиц с хронической инфекцией гепатита С. Обновленное руководство, аналитическая справка. [Электронный ресурс] - Информационный бюллетень. – 2015. – Режим доступа: <https://www.who.int/hepatitis/publications/hepatitis-c-guidelines-policy/ru/>
4. Всемирная организация здравоохранения: официальный сайт. [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <http://www.who.int/hepatitis/en>. – Дата обращения 18.05.2019.
5. Всемирная Организация Здравоохранения. Гепатит С. Информационный бюллетень. [Электронный ресурс] – 2018. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
6. Горячева, Л.Г. Циклоферон. Эффективное средство для педиатрии / Л.Г. Горячева, М.Г. Романцов, В.В., В.В. Ботвиньева ; Науч.-фармацевт. фирма "Полисан" [и др.]. – СПб. : Интермедика, 2002. – 95 с.
7. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского [Электронный ресурс]: официальный сайт. – Режим доступа: <https://sklif.mos.ru/>. – Дата обращения 23.12.2019.
8. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году» М.: Федеральная

служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019. – 200 с.

9. Ершов, Ф.И. Индукторы интерферона - новое поколение иммуномодуляторов / Ф.И. Ершов, Э.Б. Тазулахова // Журн. Микробиол. – 1996. – №3. – С. 122-125.

10. Жданов, К.В. Хроническая HCV-инфекция и экспрессия м-РНК СС-хемокинов и их рецепторов / К.В. Жданов, Д.А. Гусев, В.С. Чирский, К.А. Сысоев, Д.М. Шахманов, Л.А. Якубовская, А.А. Тотолян и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – №4. – С. 73-78.

11. Ивашкин, В.Т. Фиброз печени / В. Т. Ивашкин, Ч. С. Павлов. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 168 с.

12. Малеев, В.В. Актуальные вопросы современной гепатологии: монография / В. В. Малеев, И. Г. Ситников, М. С. Бохонов ; Центральный науч.-исслед. ин-т эпидемиологии Роспотребнадзора, Гос. бюджетное образовательное учреждение "Ярославская гос. мед. академия". – Москва ; [б. и.] ; Индиго, 2014. – 509 с.

13. Мицура, В.М. Противовирусное лечение хронического гепатита С: имеющиеся результаты и будущие перспективы // В.М. Мицура, Е.Л. Красавцев, С.В. Жаворонок и др. // Проблемы здоровья и экологии. – 2017. - №1. – Т.51. – С. 31-35 <http://elib.gsmu.by/handle/GomSMU/2397>

14. Мухина, М.В. Этиотропная терапия вирусных гепатитов [Электронный ресурс] / Н.В. Мухина, В.А. Петров Кафедра детских инфекционных болезней // ВолГМУ. – Режим доступа: <http://attic.volgmed.ru/publishing/lv/s/2006/5/lv-2006-5-011.pdf>. – Дата обращения 20.03.2019

15. Никитин, В.Ю. Противовирусный иммунитет при гепатите С. Предпосылки для фармакологической коррекции нарушений. // В.Ю. Никитин, И.А. Сухина, В.Н. Цыган. // Обзор по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2004. – Т.3. - №1. – С.34-55.

16. Пименов, Н.Н. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора / Н.Н. Пименов, С.В. Комарова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – № 3. – С. 4–10.

17. Пименов, Н. Н. Гепатит С и его исходы в России: анализ заболеваемости, распространенности и смертности до начала программы элиминации инфекции/ Н. Н. Пименов, С. В. Комарова, И. В. Карандашова, Н. Н. Цапкова, Е. В. Волчкова, В. П. Чуланов // Инфекционные болезни. – 2018. – Т. 16. № 3. – С. 37 – 45
18. Постановление правительства Российской Федерации от 1.12.2004 №715,с изменениями на 13.07.2012 «Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих» [Электронный ресурс] // Гарант.ру. – Режим доступа: <http://base.garant.ru/12137881/>. – Дата обращения 18.05.2019
19. Приложение к приказу Минздрава России от 9.11.2012 № 733н: регистрационный № 26671 «Стандарт специализированной медицинской помощи при остром гепатите С средней степени тяжести» [Электронный ресурс]: // Гарант.ру. – Режим доступа: <https://base.garant.ru/70304270/53f89421bbdaf741eb2d1ecc4ddb4c33/>
20. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С: разработаны экспертной группой по вопросам вирусных гепатитов в соответствии с поручением министра здравоохранения Российской Федерации от 06.08.2012 № 68 / М.В. Маевская, Н.Д. Ющук и др.// Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2013. – № 2. – С. 3-32.
21. Сагалова, О.И. Безинтерфероновая противовирусная терапия хронического гепатита С / О.И. Сагалова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015 . – №2 . – С. 14-18.
22. Семенова, И.В. Современные принципы терапии хронических гепатитов различной этиологии / И.В. Семенова, Ж.Б. Понежева // Архивъ внутренней медицины. – 2015. – №6. – С. 14-20.
23. Сизова, Л.М. Анализ предикторов эффективности противовирусной терапии хронического гепатита С / Л.М. Сизова // Мир медицины и биологии. – 2017. - №3. – С. 63-67.

24. Сысоев, К.А. Диагностическая роль определения хемокинов и их рецепторов при хроническом гепатите / К.А. Сысоев, А.Б. Чухловин, А.А. Тотолян // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 2. – С. 23-29.
25. Учайкин, В.Ф. Инфекционная гепатология: руководство для врачей / В.Ф. Учайкин, Т.В. Чередниченко, А.В. Смирнов. // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2012. – 627.с.
26. Фазылов, В.Х. Определение варианта полиморфизма гена интерлейкина 28В как предиктора эффективности противовирусной терапии хронического гепатита С / В.Х. Фазылов, С.В. Ткачева, Э.Р. Манапова и др. // Вестник современной клинической медицины. – 2013. - №4. – Т.6. – С. 30-32.
27. Федеральный Закон РФ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011г. N 323-ФЗ <http://base.garant.ru/12191967/>
28. Флоряну, А.И. Клинико-иммунологические аспекты и эффективность противовирусной терапии у больных хроническим вирусным гепатитом С: диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.00.10 / Флоряну Александра Ивановна; [Место защиты: ФГУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии]. - М., 2007. – 189 с.
29. Хубутя, М.Ш. Лечение гепатита С без использования препаратов интерферона у больных, перенесших трансплантацию печени / М.Ш. Хубутя, В.Е. Сюткин // Трансплантология. – 2015. – №3. – С. 65-70.
30. Чуелов, С.Б. Этиотропная терапия вирусных гепатитов / С.Б. Чуелов, А. Л. Россина, В. Ф. Учайкин. // Детские инфекции. – 2017. – №16. – С. 32-40.
31. Эсауленко, Е.В. Обоснование необходимости тройной терапии хронического гепатита С / Е.В. Эсауленко, О.Е. Никитина // Инфекционные болезни. – 2013. – Т. 11. – №2. – С. 69-73.
32. Эсауленко, Е.В. Эффективность нового отечественного интерферона альфа-2b в терапии хронического гепатита С: результаты открытого рандомизированного сравнительного исследования /Е.В. Эсауленко, О.О. Павлова, А.А Го, И.В. Осе // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2007. – №1. – С. 29-34.

33. Ющук, Н.Д. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение / Н.Д. Ющук, Е.А. Климова, О.О. Знойко и др. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 304 с.
34. Ющук, Н.Д. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение / Н.Д. Ющук, Е.А. Климова, О.О. Знойко, Г.Н. Кареткина и др. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 162 с.
35. Ahlenstiel, G. Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner / G. Ahlenstiel, R.H. Titerence, C. Koh, B. Edlich, J.J. Feld, Y. Rotman // *Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 138. – P. 325-335.
36. Andreone, P. ABT-450,ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir achieves 97% and 100% sustained virologic response with or without ribavirin in treatment-experienced patients with HCV genotype 1b infection / P. Andreone, M.G. Colombo, J.V. Enejosa // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 147 – № 2. – P. 359–365.
37. Antonelli, A. CXCL10 and CCL2 serum levels in patients with mixed cryoglobulinaemia and hepatitis C / A. Antonelli, C. Ferri, P. Fallahi, S.M. Ferrari, S. Frascerra // *Digestive and Liver Disease*. – 2009. – Vol. 41. – P.42-48.
38. Apolinario, A. Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy / A. Apolinario, M. Diago, O. Lo Iacono, R. Lorente, C. Pérez, P.L. Majano, G. Clemente, C. García-Monzón // *Aliment. Pharmacol. Therapy*. – 2004. – Vol. 19. – №5. – P. 551-562.
39. Askarieh, G. Systemic and intrahepatic interferon-gamma-inducible protein 10 kDa predicts the first-phase decline in hepatitis C virus RNA and over-all viral response to therapy in chronic hepatitis C / G. Askarieh, A. Alsio, P. Pugnale, F. Negro, C. Ferrari, A. Neumann // *Hepatology*. – 2010. – №51. – P. 1523-1530.
40. Bacon, B.R. Boceprevir for previously treated chronic HCVgenotype 1 infection / B.R. Bacon, S.C. Gordon, E. Lawitz, P. Marcellin, J.M.Vierling, S. Zeuzem // *The New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 364. – P. 1207-1217.
41. Bengsch B. CD8 + T-cell differentiation in chronic HCV infection. / B. Bengsch, R. Thimme // *Future Virology*. – 2011. – Vol. 6. – P. 249-258.

42. Berenguer, M. HCV-4-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years / M. Berenguer, I.L. Ferre, J. Watson // *Journal of Hepatology*. – 2000. – Vol. 32. – №4. – P. 673-684.
43. Berenguer, M. Clinical benefits of antiviral therapy in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation / M. Berenguer, A. Palau, V. Aguilera // *American Journal of Transplantation*. – 2008. – Vol. 8. – №3. – P. 679-687.
44. Berres, M. Serum Chemokine CXC Ligand 10 (CXCL10) Predicts Fibrosis Progression After Liver Transplantation for Hepatitis C Infection / M. Berres, C. Trautwein, M. Schmeding, D. Eurich, F. Tacke, M. Bahra, P. Neuhaus, U.P. Neumann, H.E. Wasmuth // *Hepatology*. – 2011. – Vol.53. – №2. – P. 596-603.
45. Bility, M.T. Chronic hepatitis C infection-induced liver fibrogenesis is associated with M2 macrophage activation [Электронный ресурс] / M.T. Bility, K. Nio, F. Li. // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – Режим доступа: <https://www.nature.com/articles/srep39520?proof=true>. – Дата обращения 23.12.2019.
46. Blasco, A. Hepatic venous pressure gradient identifies patients at risk of severe hepatitis C recurrence after liver transplantation / A. Blasco, X. Forns, J.A. Carrion // *Hepatology* – 2006 – Vol. 43. – P. 492-499.
47. Blight, K.J. Molecular virology of hepatitis C virus: an update with respect to potential antiviral targets / K.J. Blight, A.A. Kolykhalov, K.E. Reed, E.V. Agapov, C.M. Rice // *Antiviral Therapy*. – 1998 – Vol. 3 – P. 71-81.
48. Brown, R.S. Safety and Efficacy of New DAA-based Therapy for Hepatitis C Post-Transplant: Interval Results from the HCV-TARGET : longitudinal, observational study / R.S. Brown, K. Reddy, J.G. O'leary // *Hepatology*. – 2017. – Vol. 66. – № 4. – P. 1090-1101.
49. Burton, J.R. A US multicenter study of hepatitis C treatment of liver transplant recipients with protease-inhibitor triple therapy / J.R. Burton, J.G. O'leary // *Journal of Hepatology*. – 2014. – Vol. 61. – № 3. – P. 508-514.
50. Butera, D. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C / D. Butera, S. Marukian, A.E. Iwamaye, E. Hembrador, T.J.

- Chambers, A.M. Di Bisceglie, E.D. Charles, A.H. Talal, I.M. Jacobson, C.M. Rice, L.B. Dustin // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – N 4. – P. 1175-1182.
51. Camma, C. Effect of peginterferon alfa-2a on liver histology in chronic hepatitis C: A meta-analysis of individual patient data / C. Camma, D. Di Bona, F. Schepis // *Hepatology*. – 2004. – Vol. 39. – P. 333–342.
52. Carrat, F. Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV infected patients: a randomized controlled trial / F. Carrat, F. Bani-Sadr, S. Pol, E. Rosenthal, F. Lunel-Fabiani // *JAMA*. – 2004. – Vol. 292 – P. 2839-2848.
53. Coilly, A. Multicentre experience using daclatasvir and sofosbuvir to treat hepatitis C recurrence–The ANRS CUPILT study / A. Coilly, C. Fougerou-Leurent, V. de Ledinghen, et al. // *Journal of hepatology*. – 2016. – V.65. – №. 4. – P. 711-718.
54. Coilly, A. Practical management of boceprevir and immunosuppressive therapy in liver transplant recipients with hepatitis C virus recurrence / A. Coilly, V. Furlan, B. Roche et al. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2012. – V. 56. – №. 11. – P. 5728-5734.
55. Coilly, A. Safety and efficacy of protease inhibitors to treat hepatitis C after liver transplantation: a multicenter experience / A. Coilly, B. Roche, J. Dumortier // *Journal of Hepatology*. – 2014. – Vol. 60. – № 1. – P. 78–86.
56. Coppola, N. Efficacy of Pegylated interferon α -2a and α -2b in patients with genotype 1 chronic hepatitis C: a meta-analysis / N. Coppola, M. Pisaturo, G. Tonziello, C. Sagnelli, E. Sagnelli, I. F. Angelillo.// *BMC Infectious Diseases*. – 2012. –Vol.12. – P. 357-361.
57. Coppola, N. Improvement in the aetiological diagnosis of acute hepatitis C: a diagnostic protocol based on the anti-HCV-IgM titre and IgG Avidity Index / N. 231 Coppola, R. Pisapia, G. Tonziello, A. Masiello, S. Martini, M. Pisaturo, V. Messina, C. Sagnelli, M. Macera, G. Signoriello // *Journal of Clinical Virology*. – 2009. Vol.46. – P.222–229.
58. Crespo, G. Early non-invasive selection of patients at high risk of severe hepatitis C recurrence after liver transplantation / G. Crespo, M. Gambato, O. Millan, G. Casals, P.

- Ruiz, M.C. Londoño, A. Mira, X. Forns, M. Brunet, W. Jimenez, M. Navasa. // *Transplant Infectious Disease*. – 2016. – Vol. 18. – P. 471–479.
59. Crespo, G. Viral hepatitis in liver transplantation / G.Crespo, Z. Marino, M. Navasa // *Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 142. – № 6. – 1373–1383.
60. Diago, M. Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C / M. Diago, G. Castellano // *Gut and Liver*. – 2006. – Vol. 55. – № 3. – P. 374-379.
61. Dieterich, D. Evaluation of sofosbuvir and simeprevir-based regimens in the TRIO network: academic and community treatment of a realworld, heterogeneous population / D. Dieterich, B.R. Bacon, S.L. Flamm // *Hepatology*. – 2014. – Vol. 60. – 220 p.
62. Dubynska, H.M. Vplyv polimorfizmu heniv TLR4 ta TLR7 na shvydkist prohresuvannia fibrozu pechinky u khvorykh na khronichnyi hepatyt C / H.M. Dubynska, L.M. Syzova, T.I. Koval, O.M. Iziumska // *Hepatolohiia*. – 2016. - Vol. 1(31). – P. 23-32. [in Ukrainian].
63. Esposito, I. Hepatitis C virus resistance to the new direct-acting antivirals/ I. Esposito, J. Trinks, V. Soriano // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2016. – Vol. 12. - №10. – P. 1197-1209.
64. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection // *Journal of Hepatology*. – 2011. – Vol.55. – P.245-264.
65. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: of hepatitis C virus infection // *Journal of Hepatology*. – 2014. – Vol. 60. – 2. – P. 392-420.
66. European Association for the Study of the Liver Recommendations on Treatment of Hepatitis C // *Journal of Hepatology*. – 2015. – Vol. 63. – P. 199-236.
67. European Association of the Study of the Liver hepatitis C virus clinical practice guidelines// *Liver International*. – 2012. – Vol. 32. – Suppl. 1. – P. 2–8.
68. Feld, J.J. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C / J.J. Feld, J.H. Hoofnagle // *Nature Reviews Immunology*. – Vol. 436. – P. 967-972.

69. Feld, J.J. Treatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin / J.J. Feld, K.V. Kowdley, E. Coakley // The New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 370. – № 17. – P. 1594–1603.
70. Ferenci, P. ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with or without ribavirin for HCV / P. Ferenci, D. Bernstein, J. Lalezari // The New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 370. – P. 1983-1992.
71. Firpi, R.J. One-year protocol liver biopsy can stratify fibrosis progression in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C infection / R.J. Firpi, M.F. Abdelmalek, C. Soldevila-Pico // Liver Transplantation. – 2004. – Vol. 10. – P. 1240–1247.
72. Forns, X. Sofosbuvir compassionate use program for patients with severe recurrent hepatitis C following liver transplantation / X. Forns, M. Charlton, J. Denning // Hepatology. – 2015. – Vol. 61. – P. 1485–1494.
73. Fourati, S. Virologic Tools for HCV Drug Resistance Testing/ S. Fourati, J.M. Pawlotsky // Viruses. – 2015. – Vol. 7. - №12. – P. 6346-6359.
74. Fourati, S. Viral kinetics analysis and virological characterization of treatment failures in patients with chronic hepatitis C treated with sofosbuvir and an NS5A inhibitor / S. Fourati, J. Guedj, S. Chevaliez et al. // Alimentary pharmacology & therapeutics. – 2018. – V. 47. – №. 5. – P. 665-673.
75. Gallegos-Orozco, J.F. Natural history of post-liver transplantation hepatitis C: areview of factors that may influence its course. / J.F. Gallegos-Orozco, A. Yosephy, B. Noble, B.A. Aqel T.J. Byrne // Liver Transplantation. – 2009. – Vol. 15. – P. 1872-1881.
76. Gane, E.J. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation / E.J. Gane, B.C. Portmann, N.V. Naoumov // The New England Journal of Medicine. – 1996. – Vol. 334. – P. 815-820.
77. Gentile, I. ABT-450: a novel protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection / I. Gentile, F. Borgia, A.R. Buonomo // Current medicinal chemistry. – 2014. – Vol. 21. – №28. – P. 3261-3270.
78. Gentile, I. A novel promising therapeutic option against hepatitis C virus: an oral nucleotide NS5B polymerase inhibitor sofosbuvir/ I. Gentile, F. Borgia, A. R.

Buonomo, G. Castaldo, G. Borgia// Current medicinal chemistry. – 2013. – Vol.20. – P.3733-3742.

79. George S. Clinical, virologic, histologic, and biochemical outcomes after successful HCV therapy: A 5-year follow-up of 150 Patients / S. George, B. Bacon, E. Brunt // Hepatology. – 2009. – Vol. 49. – P. 729-738.

80. Ghany, M. G. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update / M. G. Ghany, D. B. Strader, D. L. Thomas, L. B. Seeff // Hepatology. – 2009. – Vol.49. – P.1335-1374.

81. Golden-Mason, L. NK inhibitory receptor expression associated with treatment failure and IL-28B genotype in patients with chronic hepatitis C/ L. Golden-Mason, K. M. Bambha, L. Cheng, C. D. Howell, M. W. Taylor, P. J. Clark, N. Afdhal, H. R. Rosen // Hepatology (Baltimore, Md). – 2011. – Vol.54. – № 5. – P. 1559-1569.

82. Gotte, M. Resistance to nucleotide analogue inhibitors of hepatitis C virus NS5B: mechanisms and clinical relevance/ M. Gotte // Current Opinion in Virology. – 2014. – Vol. 8. – P. 104-108.

83. Guido, M. Histology predicts cirrhotic evolution of post transplant hepatitis C / M. Guido, S. Fagiuoli, G. Tessari // Gut and Liver. – 2002. – Vol. 50. – P. 697-700.

84. Gurusamy, K. Antiviral therapy for recurrent liver graft infection with hepatitis C virus [Электронный ресурс] // Cochrane Systematic Review. – 2010. – Режим доступа: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD006803.pub2/full>. – Дата обращения 23.12.2019.

85. Gurusamy K.S. Antiviral interventions for liver transplant patients with recurrent graft infection due to hepatitis C virus [Электронный ресурс] Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2013. – Режим доступа: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD006803.pub4/epdf/abstract>. – Дата обращения 23.12.2019.

86. He, Y. CD100 up-regulation induced by interferon- α on B cells is related to hepatitis C virus infection / Y. He, Y. Guo, Y. Zhou, Y. Zhang // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9. – №12. – P. 1-12.

87. Hellier, S. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection / S. Hellier, A.J. Frodsham, B.J. Hennig, P. Klenerman, S. Knapp et. Al. // *Hepatology*. – 2003. – Vol. 38. – P. 1468-1476.
88. Heydtmann, M. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection / M. Heydtmann, P. Shields, G. McCaughan, A. David // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2001. – Vol. 14. – 279 p.
89. Houghton, M. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus / M. Houghton, S. Abrignan // *Nature Reviews Immunology*. – 2005. – Vol. 436. – 961 p.
90. Jacobson, I.M. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment - I patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial / I.M. Jacobson, G.J. Dore, G.R.Foster // *Lancet*. – 2014. – Vol 384. – P. 403-413.
91. Jacobson, I.M. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection / I.M. Jacobson, J.G. McHutchison, G. Dusheiko, A.M. Di Bisceglie, P. Ferenci, R. Flisiak // *The New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 364. – P. 2405-2416.
92. Janeway, C.A. Innate immune recognition / C.A. Janeway, R. Medzhitov // *Annual Review of Immunology*. – 2002. – Vol. 20. – P. 197-216.
93. Jensen, D.M. Safety and efficacy of sofosbuvir-containing regimens for hepatitis C: real-world experience in a diverse, longitudinal observational cohort / D.M Jensen, J.G. O’Leary, P.J. Pockros // *Hepatology*. – 2014. – Vol. 60. – 219 P.
94. Joshi, D. CXCL10 levels identify individuals with rapid fibrosis at 12 months post-transplant for hepatitis C virus and predict treatment response / D. Joshi, I. Carey, M. Foxton, M. Al-Freah, M. Bruce, K. Agarwal // *Clinical Transplantation*. – 2014. – Vol. 28. – P. 569–578.
95. Kamal, S.M. Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virusspecific T cell response kinetics / S.M. Kamal, A. Ismail, C.S. Graham, J.W.Rasenack, A.A. Tawil // *Hepatology*. – 2004. – Vol. 39. – P. 1721-1731.

96. Kamal, S.M. PEG interferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C / S.M. Kamal, J. Fehr, B. Roesler, J.W. Rasenack // *Gastroenterology*. – 2002. – Vol. 123. – P. 1070-1083.
97. Kazankov, K. Soluble CD163, a macrophage activation marker, is independently associated with fibrosis in patients with chronic viral hepatitis B and C / K. Kazankov, F. Barrera, H.M. Moller, B.M. Bibby, H. Vilstrup // *Hepatology*. – 2014. – Vol. 60. – №2. – P. 521-530.
98. Keefe, E.B. Therapy of hepatitis C: Consensus interferon trials / E.B. Keefe, F.B. Hollinger // *Hepatology*. – 1997. – Vol. 26. – P. 1015-1075.
99. Koff, R. S. Review article: the efficacy and safety of sofosbuvir, a novel, oral nucleotide NS5B polymerase inhibitor, in the treatment of chronic hepatitis C virus infection/ R. S. Koff // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 2014. – Vol.39. – P. 478-487.
100. Kurktschiev, P. D. Dysfunctional CD8+ T cells in hepatitis B and C are characterized by a lack of antigen-specific T-bet induction / P. D. Kurktschiev, B. Raziorrouh, W. Schraut, M. Backmund, M. Wächter, C. M. Wendtner, B. Bengsch, R. Thimme, G. Denk, R. Zachoval, A. Dick, M. Spannagl, J. Haas, H. M. Diepolder, M. C. Jung, N. H. Gruener // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2014. – Vol. 211. – №10. – P. 2047-2059.
101. Kwo, P.Y. An Interferon-free Antiviral Regimen for HCV after Liver Transplantation / P.Y. Kwo, P.S. Mantry, E. Coakley // *The New England Journal of Medicine*. – 2014. – Vol. 371. – № 25. – P. 375-382.
102. Lam, B.P. The changing land scape of hepatitis C virus therapy: focus on interferon-free treatment / B.P. Lam, T. Jeffers, Z. Younoszai, Y. Fazel // *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 8. – № 5. – P.298-331.
103. Larrea, E. Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C / E. Larrea, N. Garcia, C. Qian, M.P. Civeira, J. Prieto // *Hepatology*. – 1996. – Vol. 23. – № 2. – P. 210-217.
104. Larrubia, J.R. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection / J.R.Larrubia, M. Calvino,

S. Benito, E. Sanz-de-Villalobos, C. Perna, J. Perez-Hornedo, F. Gonzalez-Mateos, S. Garcia-Garzon, A. Bienvenido, T. Parra // *J.Hepatol.* – 2007. – Vol. 47. – N 5. – P. 632-641.

105. Lawitz, E. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: the COSMOS randomized study / E. Lawitz, M.S. Sulkowski, R. Ghalib // *Lancet.* – 2014. – Vol. 384. – P. 1756-1765.

106. Lawitz, E. Sofosbuvir in combination with PegIFN and ribavirin for 12 weeks provides high SVR rates in HCV-infected genotype 2 or 3 treatment experienced patients with and without compensated cirrhosis: results from the LONESTAR-2 study / E. Lawitz, F. Poordad, D.M. Brainard // *Hepatology.* – 2015. – Vol. 61. – №3. – P. 769–775.

107. Lawitz, E. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection / E. Lawitz, A. Mangia, D. Wyles // *The New England Journal of Medicine.* – 2013. – Vol. 368. – P. 1878-1887.

108. Levin, R.B. Safety and Efficacy of New DAA-based Therapy for Hepatitis C Post-Transplant: Interval Results from the HCV-TARGET Longitudinal [Электронный ресурс] // 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. – Режим доступа: http://www.natap.org/2014/AASLD/AASLD_19.htm. – Дата обращения 23.12.2019.

109. Levitsky, J. Risk for immunemediated graft dysfunction in liver transplant recipients with recurrent HCV infection treated with pegylated interferon / J. Levitsky, M.I. Fiel, J.P. Norvell // *Gastroenterology.* – 2012. – Vol. 142. – № 5. – P. 1132–1139.

110. Liang, T.J. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C / T.J. Liang, B. Rehermann, L.B Seeff, J.H. Hoofnagle // *Annals of Internal Medicine.* – 2000. – Vol. 132. – № 4. – P. 296-305.

111. Lin, J.C. Interferon γ - induced protein 10 kinetics in treatment-naïve versus treatment-experienced patients receiving interferon-free therapy for hepatitis C virus infection: implications for the innate immune response / J.C. Lin., F. Habersetzer, M.

- Rodriguez-Torres, N. Afdhal, E. Lawitz // The Journal of Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 210. – № 12. – P. 1881-1885.
112. Manns, M. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a or 2b plus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2): a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial / M. Manns, P. Marcellin, F. Poordad // Lancet. – 2014. – Vol. 384. – P. 414-426.
113. Manns, M. P. Hepatitis C virus infection / M. P. Manns, M. Buti, E. Gane et al. // Nature reviews Disease primers. – 2017. – V. 3. – №. 1. – P. 1-19.
114. Marra, F. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells / F. Marra, R.G. Romanelli, C. Giannini, P. Failli, S. Pastacaldi, M.C. Arrighi, M. Pinzani // Hepatology. – 1999. – Vol. 29. – P. 140-148.
115. Mascial C. Changes in inflammatory biomarkers in HCV-infected patients undergoing direct acting antiviral-containing regimens with or without interferon / C. Mascial, S. Vita, P. Zuccalà, R. Marocco, T. Tieghi, S. Savinelli, R. Rossi // PLoS ONE. – 2017. – V.12. - №6.
116. Micheloud, D. High rate of infection and immune disorders in patients with hepatitis C virus after liver transplantation / D. Micheloud, M. Salcedo, R. Bañares et al. // Transplant Infectious Disease. – 2009. – V. 11. – №. 4. – P. 367-372.
117. Micheloud, D. Serum levels of fibrosis biomarkers measured early after liver transplantation are associated with severe hepatitis C virus recurrence / D. Micheloud, M. Salcedo, R. Banares, D. Rincon, R. Lorente, M.A. Munoz-Fernandez // Transplant Infectious Disease. – 2009. – Vol. 11. – P. 183-188.
118. Mizuochi, T. Possible recruitment of peripheral blood CXCR3 + CD27+ CD19+ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients / T. Mizuochi, M. Ito, K. Saito, M. Kasai, T. Kunimura, T. Morohoshi, H. Momose, I. Hamaguchi, K. Yamaguchi // Journal of Interferon & Cytokine Research. – 2010. – Vol. 30. – P. 243-251.
119. Napoli, J. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines / J. Napoli, G.A. Bishop, P.H. McGuinness, D.M. Painter, G.W. McCaughan // Hepatology. – 1996. – Vol. 24. – P. 759-765.

120. Narang, T.K. Post-liver transplant cholestatic hepatitis C: a systematic review of clinical and pathological findings and application of consensus criteria / T.K. Narang, W. Ahrens, M.W. Russo // *Liver Transplantation*. – 2010. – Vol. 16. – № 11. – P. 1228-1235.
121. Negash, A.A. IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease [Электронный ресурс] / A.A. Negash, H.J. Ramos, N. Crochet // *PLOS Pathogens*. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23633957>. – Дата обращения 23.12.2019.
122. Negro, F. The global health burden of hepatitis C virus infection / F. Negro, A. Alberti // *Liver International*. – 2011. – Vol. 31. – P. 1-3.
123. Nelson, D.R. Alloral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase 3 study / D.R. Nelson, J.N. Cooper, J.P. Lalezari // *Hepatology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1127-1135.
124. Neumann, U.P. Fibrosis progression after liver transplantation in patients with recurrent hepatitis C / U.P. Neumann, T. Berg, M. Bahra, D. Seehofer, J.M. Langrehr, R. Neuhaus // *Journal Hepatology*. – 2004. – Vol. 41. – P. 830-836.
125. Naveau, S. Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease / S. Naveau, G. Gaude, A. Asnacion // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 49. – № 1. – P. 97-105.
126. Oliveira, I. Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12 weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin / I. Oliveira, L. Carvalho, M. Schinoni, R. Paraná, A.M. Atta, M.L.B. Atta // *Microbial Pathogenesis*. – 2016. – Vol. 91. – P. 155-160.
127. Pawlotsky, J.M. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C / J.M. Pawlotsky // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 59. – №2. – P. 375-382.
128. Pawlotsky, J.M. New hepatitis C virus (HCV) drugs and the hope for a cure: concepts in anti-HCV drug development / J.M. Pawlotsky // *Seminars in Liver Disease*. – 2014. – 34. – №1. – P. 22-29.

129. Pawlotsky, J.M. Treatment of chronic hepatitis C / J.M. Pawlotsky // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2013. – Vol. 369. – P. 321-342.
130. Peters, M. Immunology and the liver / M. Peters, J. Vierling, M.E. Gershwin, D. Milich, F.V. Chisari, J.H. Hoofnagle // Hepatology. – 1991. – Vol. 13. – P. 977-994.
131. Poordad, F. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection / F. Poordad., J. McCone, B.R. Bacon, S. Bruno, M.P. Manns, M.S. Sulkowski, I.M. Jacobson, K.R. Reddy, Z.D. Goodman, N. Boparai // The New England Journal of Medicine. – 2011. – Vol.364. – P.1195-1206.
132. Poordad, F. ABT-450/ r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis / F. Poordad, C. Hezode, R. Trinh // The New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 370. – № 21. – P. 1973-1982.
133. Poveda, E. Resistencia a telaprevir / E. Poveda, F. Garcia // Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica. – 2013. – Vol. 31. - №3. – P. 26-32.
134. Poveda, E. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents / E. Poveda, D.L. Wyles, A. Mena, J.D. Pedreira, A. Castro-Iglesias, E. Cachay // Antiviral Research. – 2014. – Vol. 108. – P. 181-191.
135. Prieto, M. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes / M. Prieto, M. Berenguer, J.M. Rayon // Hepatology. – 1999. – Vol. 29. – №1. – P. 250-256.
136. Pungpapong, S. Multicenter experience using telaprevir or boceprevir with peginterferon and ribavirin to treat hepatitis C genotype 1 after liver transplantation / S. Pungpapong, B.A. Aql, I.L. Kon // Liver Transplantation. – 2013. – Vol. 19. – № 7. – P. 690-700.
137. Rahman, F. Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C / F. Rahman, T. Heller, Y. Sobao, E. Mizukoshi, M. Nascimbeni, H. Alter, S. Herrine, J. Hoofnagle, T.J. Liang, B. Rehermann // Hepatology,. – 2004. – Vol. 40. – P. 87-97.
138. Randal, J. Hepatitis C vaccine hampered by viral complexity, many technical restraints / J. Randal // Journal of the National Cancer Institute. – 1999. – Vol. 91. – № 11. – P. 906-908.

139. Reddy, K.R. Simeprevir versus telaprevir with peginterferon and ribavirin in previous null or partial responders with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (ATTAIN): a randomized, double-blind, non-inferiority phase 3 trial / K.R. Reddy, S. Zeuzem, F. Zoulim // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 15. – P. 27-35.
140. Rehermann, B. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection / B. Rehermann, M. Nascimbeni // *Nature Reviews Immunology*. – 2005. – Vol. 5. – P. 215-229.
141. Romero, A.I. Westin Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection / A. I. Romero, M. Lagging, // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 194. – N 7. – P. 895- 903.
142. Saab, S. Boceprevir in liver transplant recipients / S. Saab, V. Manne, S. Bau // *Liver International*. – 2015. – Vol. 35. – № 2. – P.192-197.
143. Samuel, D. Sofosbuvir and ribavirin for the treatment of recurrent hepatitis C infection after liver transplantation: results of a prospective, multicenter Study / D. Samuel, M. Charlton, E. Gane // *Journal of Hepatology*. – 2014. – Vol. 60. – 26 p.
144. Sarrazin, C. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection / C. Sarrazin, C. Hézode, S. Zeuzem et al. // *Journal of hepatology*. – 2012. – V. 56. – P. S88-S100.
145. Selzner, N. Immune-mediated complications of the graft in interferon-treated hepatitis C positive liver transplant recipients / N. Selzner, M. Guindi, E.L. Renner // *Journal of Hepatology*. – 2011. – Vol. 55. – № 1. –P. 207–217.
146. Serti, E. Successful Interferon-Free Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection Normalizes Natural Killer Cell Function / E. Serti, X. Chepa-Lotrea, Y.J. Kim, M. Keane, N. Fryzek, T.J. Liang // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol.149. – № 1. – P. 190-200.
147. Shields, P.L. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver / P.L. Shields, C.M. Morland, M. Salmon, Q. Shixin, S.G. Hubscher, D.H. Adams // *The Journal of Immunology*. – 1999. – Vol. 163. – №11. – P. 6236-6243.

148. Soldevila, B. A prospective study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4 + CD25+ CD127low/-FoxP3 + T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferonalpha2a plus ribavirin treatment / B. Soldevila, N. Alonso, M. Martines-Arconada, R.M. Morillas, R. Planas, A.M. Sanmartí, E.M. MartínezCáceres // *Journal of Viral Hepatitis*. – 2011. – Vol.18. – P. 384-392.
149. Soriano, V. Long-term follow-up of HIV-infected patients with chronic hepatitis C virus infection treated with interferon based therapies / V. Soriano, I. Maida, M. Núñez, J. García-Samaniego, et al. // *Antiviral Therapy*. – 2004. – Vol. 9. – P. 987-992.
150. Stedman, C. A. M. Current prospects for interferon - free treatment of hepatitis C in 2012 / C.A.M. Stedman // *Journal of gastroenterology and hepatology*. – 2013. – V. 28. – №. 1. – P. 38-45.
151. Stedman, C. Sofosbuvir, a NS5B polymerase inhibitor in the treatment of hepatitis C: a review of its clinical potential / C. Stedman // *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 7. – №3. – P. 131-140.
152. Strickland, G. T. Hepatitis C vaccine: supply and demand / G.T.Strickland, S.S. El-Kamary, P. Klenerman, A. Nicosia // *The Lancet. Infectious diseases*. – 2008. – Vol. 8. – № 6. – P. 379-386.
153. Sulkowski, M.S. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection / M.S. Sulkowski, D.F. Gardiner, M. Rodriguez-Torres // *The New England Journal of Medicine* – 2014. – Vol. 370. – P. 211- 221.
154. Suppiah, V. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy./ V. Suppiah, M. Moldovan, G. Ahlenstiel, T. Berg, M. Weltman, M.L. Abate, M. Bassendine, U. Spengler, G.J. Dore, E. Powell. // *Nat Genet*. 2009. – Vol.41–P. 1100–1104.
155. Szabo, G. Innate immune response and hepatic inflammation / G. Szabo, P. Mandrekar, A. Dolganiuc // *Seminars in Liver Disease*. –2007. – Vol. 2. – №4. – P. 339-350.

156. Taghavi, S.A. Successful interferon desensitization in a patient with chronic hepatitis C infection / S.A. Taghavi, A. Eshraghian // *World Journal of Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 15(33). – P. 4196-4198.
157. Tomei, L. HCV antiviral resistance: the impact of in vitro studies on the development of antiviral agents targeting the viral NS5B polymerase / L. Tomei, S. Altamura, G. Paonessa, R. De Francesco, G. Migliaccio // *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 16. - №4. – P. 225-245.
158. Torriani, F.J. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients / F.J. Torriani, M. Rodriguez-Torres, J.K. Rockstroh, E. Lissen // *The New England Journal of Medicine*. – 2004. – Vol. 351. – P. 438-50.
159. Trabaud, M.A. Comparison of HCV RNA assays for the detection and quantification of hepatitis C virus RNA levels in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon / M.A. Trabaud, F. Bailly, S.N. Si-Ahmed, P. Chevallier, M. Sepetjan, G. Colucci // *Journal of Medical Virology*. – 1997. – Vol. 52. – P.105-112.
160. Van der Meer, A.J. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis / A.J. Van der Meer, B.J. Veldt, J.J. Feld, H. Wedemeyer, J. F. Dufour, F. Lammert et al. // *JAMA*. – 2012. – Vol. 308. – №24. – P. 2584-2593.
161. Wald O. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics / O.D. Wald, E. Weiss, A. Peled. // *Cytokine*. – 2007. – Vol. 39. – №. 1. – P. 50–62.
162. Werner, C.R. First-generation protease inhibitor-triple therapy: SVR 24, safety, and predictors of response in a large single center cohort / C.R. Werner, C. Franz, D.P. Egetemeyr, R. Beck, N.P. Malek, U.M. Lauer et al. // *Virology Journal*. – 2015. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889921>. – Дата обращения 23.12.2019.
163. Yamauchi, K. Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3 α in chronic viral hepatitis: prognostic importance of macrophage inflammatory protein-3 α during interferon therapy in chronic hepatitis C / K. Yamauchi, S.M.F. Akbar, N.

Horiike, K. Michitaka, M. Onji // Journal of Viral Hepatitis. – 2002. – Vol. 9. – № 3. – P. 213-220.

164. You, C.R. Serum IP-10 Levels Correlate with the Severity of Liver Histopathology in Patients Infected with Genotype-1 HCV / C.R. You, S.H. Park, S.W. Jeong, H.Y.Woo, S.H. Bae, J.Y. Choi // Gut Liver. – 2011. – Vol. 5. – №4. – P. 506-512.

165. Zeremski, M. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C / M. Zeremski, L.M. Petrovic, L. Chiriboga, Q. B. Brown, H.T. Yee, M. Kinkhabwala. // Hepatology. – 2008. – Vol. 48. – P.1440-1450.

166. Zeremski, M. Peripheral CXCR3-associated chemokines as biomarkers of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection / M. Zeremski, R. Dimova, Q. Brown, M. Jacobson, M. Markatou, A.H.Talal // The Journal of Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 200. – P. 1774-1780.

167. Zeuzem, S. Telaprevir for retreatment of HCV infection / S. Zeuzem, P. Andreone, S. Pol, E. Lawitz, M. Diago, S, Roberts // The New England Journal of Medicine. – 2011. – Vol. 364. – P. 2417-2428.

168. Zeuzem, S. Retreatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin / S. Zeuzem, I.M. Jacobson, T. Baykal // The New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 370. – №17. – P. 1604–1614.

169. Zeuzem, S. Sofosbuvir and ribavirin in HCV genotypes 2 and 3 / S. Zeuzem, G.M. Dusheiko, R. Salupere // Gastroenterology. – 2014. – Vol. 370. – P. 1993-2001.