

На правах рукописи



Сахарова Дарья Александровна

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА
ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ В ПАТОГЕНЕЗЕ
ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С**

14.03.03 - патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Чита - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Заслуженный работник высшей школы РФ, доктор медицинских наук, профессор **Витковский Юрий Антонович**

Официальные оппоненты:

Савченко Андрей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»,
заведующий лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии

Попов Александр Федорович – доктор медицинских наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры инфекционных болезней

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иркутск

Защита состоится «13» февраля 2020 года в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.118.02 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 672000, Забайкальский край, г. Чита, ул. Горького, 39а.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а) и на сайте <https://chitgma.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ года

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.118.02
доктор медицинских наук, доцент

 Н.А. Мироманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Хронический вирусный гепатит С (ХВГС) остается одной из актуальных тем современной инфектологии. По данным Всемирной организации здравоохранения, около 1 % населения планеты или 70 миллионов человек, инфицировано вирусом гепатита С (WHO, 2019). Согласно официальным данным Роспотребнадзора, в 2016 году заболеваемость ХВГС в России составила 36,2 на 100 тыс. человек населения, что существенно превышает среднемировой показатель (23,7 на 100 тыс. в 2016 году).

Помимо высокой распространенности HCV-инфекции, серьезной проблемой является высокая частота латентности течения и хронизации, достигающая 85 % (Еналеева Д.Ш. и др., 2015; Ющук Н.Д. и др., 2019; Walker M.R. et al., 2019). Считается, что это обусловлено «ускользанием» вируса от иммунного надзора (Понежева Ж.Б., 2011; Horner S.M., 2014; Skums P. et al., 2015) ввиду изменчивости возбудителя и интенсивной репликации (Жданов К.В. и др., 2014; Alter H.J., 2019). В тоже время, наличие хронической HCV-инфекции является следствием нарушений в одном или нескольких компонентах иммунной системы, осуществляющих защиту организма от инфекции (Tagg A.W. et al., 2012; Luxenburger H. et al., 2018), в том числе, выражающихся в неэффективности цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа (Alter H.J., 2019; Patra T. et al., 2019).

При этом течение ХВГС является весьма вариабельным – у 15-20 % больных данной инфекцией развивается цирроз печени в течение 15-20 лет от момента инфицирования, а у части пациентов имеет место медленное прогрессирование фиброзирования без формирования цирроза печени на протяжении всей жизни (Таратина О.В. и др., 2017; Alter H.J. et al., 2019). Данный факт может быть объяснен не столько прямым цитопатическим эффектом вируса, сколько индивидуальным реагированием иммунной системы человека на воздействие инфекционного агента, что и определяет особенности

течения и исходов заболевания (Дудина К.Р. и др., 2013; Vranjkovic A. et al., 2019; Walker M.R. et al., 2019). По мнению ряда авторов, именно индивидуальные особенности воспалительной реакции на вирус влияют на скорость фиброгенеза (Семенова Н.А., 2010; Peng H., 2018; Patra T. et al., 2019), а в повреждении клеток печени главную роль играет клеточный иммунный ответ (Irshad M. et al., 2019). Таким образом, если хроническое течение данной инфекции в основном обусловлено взаимодействием вируса и иммуногенетических факторов организма человека (Жданов К.В. и др., 2014), то патогенез повреждения печени может быть объяснен главным образом иммунным ответом (Irshad M. et al., 2019). В этой связи, генетические факторы хозяина являются важными в определении восприимчивости и исхода HCV-инфекции.

Поэтому в последние десятилетия активно ведется поиск генетических детерминант в качестве ранних маркеров риска развития фиброзирования и последующего цирроза печени при ХВГС (Дудина К.Р. и др., 2013; Alter H.J., 2019). Несмотря на существенные достижения в изучении иммунопатогенеза при ХВГС, приходится констатировать, что некоторые патогенетические механизмы остаются невыясненными. В частности, в современных источниках отсутствуют комплексные исследования, касающиеся индивидуального генетического прогнозирования риска развития хронического вирусного гепатита С, следовательно, данный аспект проблемы представляет серьезный научный интерес.

Цель исследования: изучение роли полиморфизмов генов рецептора CD14, Toll-like-рецепторов, рецептора к иммуноглобулину G и β -дефензинов в иммунологическом звене патогенеза хронического вирусного гепатита С.

Задачи исследования:

1. Проанализировать характер распределения генотипов и аллельных вариантов гена рецептора CD14 (C-159T), генов Toll-like-рецепторов: TLR2 (Arg753Gln), TLR3 (Phe412Leu), TLR4 (Asp299Gly), TLR4 (Thr399Ile), TLR6 (Ser249Pro), TLR9 (T-1237C) и TLR9 (A2848G), гена рецептора к

иммуноглобулину G-FCGR2A (His166Arg), генов дефензина бета 1 (G-20A; G-52A) среди здоровых и лиц с хроническим вирусным гепатитом С в Забайкальском крае.

2. Исследовать популяции и субпопуляции лимфоцитов, лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С.

3. Изучить состояние клеточного иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию у больных хроническим вирусным гепатитом С в зависимости от носительства разных генотипов полиморфизмов генов рецептора CD14, Toll-like-рецепторов, рецептора к иммуноглобулину G и β -дефенинов.

4. Разработать модель индивидуального прогнозирования риска развития хронического вирусного гепатита С с использованием изучаемых SNP иммунорегуляторных молекул.

Научная новизна. Впервые установлена связь полиморфных вариантов гена рецептора CD14 (C-159T), генов TLR4 (Thr399Ile) и TLR9 (A2848G), гена дефензина бета 1 (G-20A) с предрасположенностью к развитию хронического вирусного гепатита С.

Выявлено, что частота встречаемости у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С аллеля T и генотипа T/T SNP гена CD14 (C-159T) выше, чем у здоровых доноров. Генотип Ile/Ile полиморфизма TLR4 (Thr399Ile) выявлялся только у больных хроническим вирусным гепатитом С. Аллель G и генотип G/G SNP гена TLR9 (A2848G) чаще обнаруживались при хронической HCV-инфекции в сравнении со здоровыми резидентами. Распространенность аллеля A и генотипа A/A полиморфизма дефензина бета 1 (G-20A) среди больных хроническим вирусным гепатитом С выше, чем у здоровых.

Впервые показано значительное снижение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных хроническим вирусным гепатитом С.

Впервые описано состояние клеточного иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных хроническим вирусным гепатитом С в зависимости от носительства разных генотипов мутаций гена рецептора CD14,

генов Toll-like-рецепторов, гена дефензина бета 1. Впервые обнаружено, что генотипы T/T, C/T и аллель T полиморфизма CD14 (C-159T) ассоциированы со снижением популяций активированных T-лимфоцитов и активированных T-киллеров. Генотип Ile/Ile полиморфизма TLR4 (Thr399Ile) сопряжен с увеличением содержания активированных T-лимфоцитов, T-хелперов и T-киллеров, T-NK-клеток и увеличением показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. Показано, что генотипы G/G, A/G и аллель G полиморфизма TLR9 (A2848G) ассоциированы со снижением числа активированных T-хелперов. Обнаружено, что для носителей генотипа A/A полиморфизма дефензина- β -1 (G-20A) характерно увеличение содержания NK-клеток до контрольных значений.

Теоретическая и практическая значимость работы. В исследовании представлены новые данные о распространенности различных аллельных вариантов гена рецептора CD14 (C-159T), генов Toll-like-рецепторов: TLR2 (Arg753Gln), TLR3 (Phe412Leu), TLR4 (Asp299Gly), TLR4 (Thr399Ile), TLR6 (Ser249Pro), TLR9 (T-1237C) и TLR9 (A2848G), гена рецептора к иммуноглобулину G-FCGR2A (His166Arg), генов дефензина бета 1 (G-20A; G-52A) среди здоровых резидентов Забайкальского края и у больных хроническим вирусным гепатитом С.

SNP генов CD14 (C-159T), TLR4 (Thr399Ile), TLR9 (A2848G), DEFB1 (G-20A) ассоциированы с развитием хронического вирусного гепатита С.

Носительство однонуклеотидных мутаций CD14 (C-159T), TLR4 (Thr399Ile), TLR9 (A2848G) и дефензина- β -1 (G-20A) оказывает значительное влияние на состояние клеточного иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию при хроническом вирусном гепатите С.

На основании полученных данных разработана новая модель индивидуального прогнозирования развития хронического вирусного гепатита С. Полученные результаты могут послужить основой для разработки новых подходов к прогнозированию хронической HCV-инфекции у носителей определенных генотипов.

Методология и методы исследования. Проведено комплексное исследование 74 пациентов с диагнозом хронического вирусного гепатита С. Группу здоровых лиц составили 66 волонтеров. Все обследованные – представители европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края.

В работе применялись лабораторные (генетические, иммунологические) и статистические методы исследований. Для исследования использовались цельная кровь и ее сыворотка/плазма; забор материала осуществлялся однократно в 1-2 сутки госпитализации. Для анализа полиморфизмов генов был использован метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией. Иммунологические исследования осуществлялись при помощи проточной цитофлюорометрии. Определение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии проводили по методу Ю.А. Витковского и соавт. (1999).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Генетическая составляющая подверженности к хроническому вирусному гепатиту С является существенной: полиморфные варианты гена рецептора CD14 (C-159T), генов TLR4 (Thr399Ile) и TLR9 (A2848G), гена дефензина бета 1 (G-20A) ассоциированы с хронической HCV-инфекцией.

2. Вне зависимости от клинических проявлений хронического вирусного гепатита С выявлены общие изменения иммунного статуса и снижение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных, свидетельствующие о нарушении Т-клеточного иммунного ответа при хронической HCV-инфекции.

3. Носительство полиморфных вариантов гена рецептора CD14 (C-159T), генов TLR4 (Thr399Ile) и TLR9 (A2848G), гена дефензина бета 1 (G-20A) вносит существенный вклад в иммунопатогенез хронического вирусного гепатита С при помощи изменений патогенетически значимых количественных признаков клеточного иммунитета: мутации CD14 (C-159T) и TLR9 (A2848G) приводят к снижению активации и дисфункции Т-лимфоцитов; мутация

TLR4 (Thr399Ile) наоборот, к патологическому повышению их активности; мутация дефензина бета 1 (G-20A) оказывает положительное влияние на показатели иммунограммы.

4. Модель многофакторной редукции размерности с использованием сведений об SNP генов CD14 (C159T), DEFB1 (G-20A), TLR9 (A2848G) позволяет провести индивидуальное прогнозирование развития хронического вирусного гепатита С.

Внедрение результатов исследования. Результаты настоящего исследования о влиянии носительства полиморфных вариантов ряда генов на иммунопатогенез хронического вирусного гепатита С внедрены в научно-исследовательскую деятельность и учебный процесс на кафедре инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, а также в лечебно-диагностическую работу ГУЗ «Краевая клиническая инфекционная больница» Забайкальского края.

Степень достоверности. Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом клинического материала и выполненными исследованиями с использованием современных методов, сертифицированного оборудования и реактивов, с применением статистической обработки полученных результатов при непосредственном участии автора в сборе и анализе данных.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на межрегиональной научно-практической конференции «Медицинские технологии и оборудование» (Чита, 2012); XVIII Российском конгрессе «Гепатология сегодня» (Москва, 2013); V-ом ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2013); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию Читинской государственной медицинской академии «Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины» (Чита, 2013); на Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию

Читинской государственной медицинской академии «Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины» (Чита, 2018).

Публикация материалов исследования. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 4 тезисов в сборниках материалов международных, российских и межрегиональных научных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, главы собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Данные проиллюстрированы 21 таблицей, 2 рисунками. Библиографический указатель включает 309 источников, из них 96 отечественных и 213 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 года. Исследование одобрено в локальном этическом комитете ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России 11.03.2012 года, протокол № 35.

Клиническая характеристика обследованных. В работу включены 2 группы исследуемых. Клиническая группа состояла из 74 больных хроническим вирусным гепатитом С в возрасте от 18 до 48 лет. Диагноз ХВГС устанавливали на основании клинико-anamnestических данных, биохимического, серологического и молекулярно-генетического методов, инструментального исследования.

Критерии исключения из клинической группы: инфицирование другими гепатотропными вирусами и/или вирусом иммунодефицита человека; цирроз печени; токсический гепатит; аутоиммунный гепатит; наличие внепеченочных проявлений вирусного гепатита; тяжелая соматическая патология; алкоголизм, наркомания; воспалительные заболевания любой локализации; женщины в период беременности и лактации; пациенты, получающие противовирусную терапию по поводу ХВГС.

Контрольную группу составили 66 здоровых человек, не имеющих хронического вирусного гепатита С, сопоставимых с группой исследованных по полу и возрасту. Все лица, включенные в исследование – представители европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края.

Лабораторные методы исследований. Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической венозной крови. Для анализа точечных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов применялся метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией. В работе использовались стандартные наборы реактивов НПФ «Литех» (Москва).

Иммунологическое обследование проводили стандартным методом с помощью проточной цитофлюорометрии на цитофлюориметре «Cytomics FC-500» (Beckman Coulter, USA).

Определение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) проводили по методу, предложенному Ю.А. Витковским и соавт. (1999).

Способы статистической обработки полученных результатов. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2007, Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) и MDR 3.0 (Multifactor Dimensionality Reduction). Для описания количественных результатов исследования использовали медиану (Me) с интерквартильным (25-й и 75-й перцентили) интервалом. Сравнение двух несвязанных групп проводили по критерию Манна-Уитни. Для определения популяционного

равновесия частот аллельных вариантов генов применялся закон Харди-Вайнберга. При сравнении распределений частот генотипов и аллелей использовался критерий хи-квадрат Пирсона (χ^2). Об ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к изучаемой патологии судили по величине относительного риска заболевания (OR) и отношению шансов (OR). Границы 95 %-го доверительного интервала (CI) вычисляли методом В. Woolf. Значения уровня $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование генетических полиморфизмов некоторых генов у больных хроническим вирусным гепатитом С

В ходе анализа результатов молекулярно-генетического исследования большинство изучаемых мутаций соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Исключением стали отклонения распределения наблюдаемых и ожидаемых частот полиморфизма TLR2 (Arg753Gln) для клинической группы и полиморфизмов TLR4 (Asp299Gly), G-FCGR2A (His166Arg) и DEFB1 (G-52A) для контрольной, что не дает нам возможность сравнивать носительство этих мутаций в исследуемых группах.

В таблице 1 представлены только значимые отличия между частотами генотипов и аллелей изучаемых полиморфизмов.

Частота генотипов мутации CD14 (C-159T) в контрольной группе была следующей: нормальная гомозигота (C/C) – 48,5 %, гетерозигота (C/T) – 43,9 %, мутантная гомозигота (T/T) – 7,6 %. Среди больных ХВГС частота генотипов мутации CD14 (C-159T) составила: C/C – 32,4 %, C/T – 39,2 %, T/T – 28,4 %, отличаясь от контрольной группы ($\chi^2=10,57$, $p=0,005$). Соответственно, получены отличия в частоте встречаемости аллелей C и T гена CD14 (C-159T) ($\chi^2=9,93$; $p=0,002$).

Выявлено, что среди больных ХВГС в 3,7 раза чаще встречались носители мутантного T/T-генотипа SNP CD14 (C-159T), для которых степень риска развития заболевания составила 4,83 [CI 95%: 1,7-13,71]. Носители

генотипа дикого типа в гомозиготном состоянии преобладали в 1,5 раза среди здоровых резидентов, OR для развития ХВГС составил 0,51 [0,26-1,01]. Для обладателей нормальной аллели С OR равен 0,45 [0,28-0,75], для носителей мутантной аллели Т степень риска развития ХВГС составила 2,20 [1,34-3,60]. Поэтому носительство мутантной аллели полиморфизма CD14 (C-159T) в гомозиготном состоянии предрасполагает к данной патологии.

Таблица 1

Частота генотипов и аллелей изучаемых мутаций, которые показали значимые отличия в исследуемой и контрольной группах

Генотипы и аллели	Больные ХВГС n = 74	Контроль n = 66	χ^2	p	OR (95% CI)
CD14 (C-159T)					
Генотип C/C	0,324	0,485	10,57	0,005	0,51 (0,26-1,01)
Генотип C/T	0,392	0,439			0,82 (0,42-1,61)
Генотип T/T	0,284	0,076			4,83 (1,7-13,71)
Аллель С	0,520	0,705	9,93	0,002	0,45 (0,28-0,75)
Аллель Т	0,480	0,295			2,20 (1,34-3,60)
TLR4 (Thr399Ile)					
Генотип Thr/Thr	0,811	0,682	6,16	0,049	2,00 (0,92-4,36)
Генотип Thr/Ile	0,162	0,318			0,41 (0,19-0,93)
Генотип Ile/Ile	0,027	0,000			4,59 (0,22-97,3)
Аллель Thr	0,892	0,841	1,58	0,21	1,56 (0,78-3,14)
Аллель Ile	0,108	0,159			0,64 (0,32-1,29)
TLR9 (A2848G)					
Генотип A/A	0,095	0,333	12,56	0,0002	0,21 (0,08-0,53)
Генотип A/G	0,581	0,470			1,57 (0,80-3,06)
Генотип G/G	0,324	0,197			1,96 (0,90-4,26)
Аллель А	0,385	0,568	9,38	0,002	0,48 (0,30-0,77)
Аллель G	0,615	0,432			2,10 (1,30-3,39)
DEFB1 (G-20A)					
Генотип G/G	0,311	0,439	5,86	0,049	0,58 (0,29-1,15)
Генотип G/A	0,432	0,455			0,91 (0,47-1,78)
Генотип A/A	0,257	0,106			2,91 (1,14-7,46)
Аллель G	0,527	0,667	5,64	0,02	0,56 (0,34-0,90)
Аллель А	0,473	0,333			1,79 (1,11-2,91)

Примечание: n – количество обследованных, χ^2 – хи-квадрат, OR – отношение шансов, 95% CI – 95 % доверительный интервал OR, p – уровень значимости различий между группами.

Частота аллельного полиморфизма TLR4 (Thr399Ile) у больных ХВГС не отличалась от таковой у здоровых лиц. Однако, в распределении генотипов указанных SNP в исследуемых группах выявлялись различия ($\chi^2=6,16$; p=0,049).

Так, в основной группе встречалась мутантная аллель TLR4 (Thr399Ile) в гомозиготном состоянии, чего не отмечалось у здоровых людей. Степень риска развития ХВГС у носителей генотипа Ile/Ile составила 4,59 [0,22-97,3], у гетерозигот – 0,41 [0,19-0,93].

По полиморфизму TLR9 (A2848G) получены существенные отличия как для частот генотипов, так и для частот аллелей между группами здоровых и пациентов с ХВГС. Частота генотипов мутации TLR9 (A2848G) в контрольной группе представлена следующим образом: нормальная гомозигота (A/A) – 33,3 %, гетерозигота (A/G) – 47,0 %, мутантная гомозигота (G/G) – 19,7 %. Среди больных ХВГС частота генотипов данной мутации составила: A/A – 9,5 %, A/G – 58,1 %, G/G – 32,4 % ($\chi^2=12,56$; $p=0,0002$). У здоровых лиц частота встречаемости аллели А гена TLR9 (A2848G) составила 0,568, а аллели G – 0,432; у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С аллель А выявлялась с частотой 0,385, аллель G – 0,615 ($\chi^2=9,38$; $p=0,002$).

Среди больных ХВГС в 1,6 раза чаще встречались носители мутантного G/G-генотипа SNP TLR9 (A2848G), для которых степень риска развития заболевания составила 1,96 [0,90-4,26]. Гетерозигот оказалось также больше, чем среди представителей группы контроля, для них степень риска развития ХВГС определена как 1,57 [0,80-3,06]. Носители генотипа дикого типа в гомозиготном состоянии преобладали среди здоровых резидентов. Для обладателей нормальной аллели А OR равен 0,48 [0,30-0,77], для носителей мутантной аллели G степень риска развития хронического вирусного гепатита С составила 2,10 [1,30-3,39].

Среди здоровых и больных обнаружены отличия носительства SNP DEFB1 (G-20A). В контрольной группе встречаемость нормальной гомозиготы (G/G) составила 43,9 %, гетерозиготы (A/G) – 45,5 %, мутантной гомозиготы (A/A) – 10,6 %. Среди больных ХВГС генотип G/G выявлен у 31,1 %, A/G – у 43,2 %, A/A – у 25,7 % ($\chi^2=5,86$; $p=0,049$). Среди здоровых лиц частота встречаемости аллели G гена DEFB1 (G-20A) составила 0,667, а аллели А – 0,333; у пациентов с ХВГС аллель G встречалась с частотой 0,527, аллель А –

0,473 ($\chi^2=5,64$; $p=0,02$). Среди больных ХВГС в 2,4 раза чаще встречались носители мутантного A/A-генотипа DEFB1 (G-20A), для которых степень риска развития заболевания составила 2,91 [1,14-7,46]. Носители генотипа дикого типа G/G в гомозиготном состоянии преобладали среди здоровых резидентов. Для обладателей нормальной аллели G OR равен 0,56 [0,34-0,90], для носителей мутантной аллели A степень риска развития хронического вирусного гепатита С составила 1,79 [1,11-2,91]. Следовательно, носительство мутантной аллели в гомозиготном состоянии может predispose к ХВГС.

2. Показатели клеточного иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при хроническом вирусном гепатите С

Показатели иммунограммы у больных ХВГС (n=74), в сравнении с контрольной группой (n=66), представлены в таблице 2.

Таблица 2

Значения показателей иммунограммы у здоровых и больных ХВГС

Показатель	Группа	Me (25; 75)	Критерий Манна-Уитни
Lymphocytes (CD45+), %	Контроль	23,9 (15,8; 27,5)	3,2049; p=0,0013
	ХВГС	28,9 (24,2; 32,6)	
Lymphocytes (CD45+), абс	Контроль	1841 (1539; 2082)	1,6278; p=0,1036
	ХВГС	2247 (1747; 2672)	
T-cell (CD3+), %	Контроль	75,5 (71,8; 79,6)	2,1685; p=0,0301
	ХВГС	79,4 (75,3; 83,2)	
T-cell (CD3+), абс	Контроль	1337 (1118; 1619)	2,1629; p=0,0306
	ХВГС	1696 (1374; 2089)	
T-help (CD3+CD4+), %	Контроль	44,1 (36,4; 51,4)	2,3262; p=0,0200
	ХВГС	49,9 (44,3; 54,6)	
T-help (CD3+CD4+), абс	Контроль	859 (673; 1119)	2,3600; p=0,0183
	ХВГС	1045 (819; 1326)	
T-killer (CD3+CD8+), %	Контроль	25,8 (21,9; 31,5)	0,7829; p=0,4337
	ХВГС	26,2 (20,9; 29,8)	
T-killer (CD3+CD8+), абс	Контроль	493 (377; 687)	0,7041; p=0,4814
	ХВГС	551 (450; 693)	
CD4+/CD8+	Контроль	1,7 (1,25; 2,1)	1,6053; p=0,1084
	ХВГС	2,1 (1,5; 2,4)	
T-cellAktiv (CD3+HLA-DR+), %	Контроль	6,3 (4,4; 10,9)	1,2335; p=0,2174
	ХВГС	5,5 (4,2; 7,3)	
T-cellAktiv (CD3+HLA-DR+), абс	Контроль	150 (83; 212)	0,4168; p=0,6768
	ХВГС	128 (90; 172)	
T-helpAktiv (CD3+CD4+HLA-DR+), %	Контроль	2,6 (1,5; 4,7)	2,0559; p=0,0398
	ХВГС	1,8 (1,4; 2,3)	

T-helpAktiv (CD3+CD4+HLA-DR+), абс	Контроль	42 (23; 51)	0,9857; p=0,3243
	ХВГС	34 (20; 43)	
T-killerAktiv (CD3+CD8+HLA-DR+), %	Контроль	2,9 (1,9; 6,5)	2,1798; p=0,0293
	ХВГС	2,3 (1,4; 4,0)	
T-killerAktiv (CD3+CD8+HLA-DR+), абс	Контроль	43 (28; 62)	0,6474; p=0,5172
	ХВГС	47 (31; 83)	
B-cell (CD19+), %	Контроль	9,7 (7,9; 12,9)	0,4900; p=0,6241
	ХВГС	10,0 (6,2; 13,8)	
B-cell (CD19+), абс	Контроль	179 (153; 278)	0,4900; p=0,6241
	ХВГС	186 (116; 350)	
NK-cell (CD3- CD16+CD56+), %	Контроль	7,4 (3,2; 9,5)	3,2725; p=0,0011
	ХВГС	2,5 (0,8; 6,0)	
NK-cell (CD3- CD16+CD56+), абс	Контроль	156 (57; 255)	3,3175; p=0,0009
	ХВГС	53 (16; 147)	
T-NK-cell (CD3+CD16+CD56+), %	Контроль	1,5 (0,6; 3,3)	2,6754; p=0,0074
	ХВГС	0,5 (0,1; 1,5)	
T-NK-cell (CD3+CD16+CD56+), абс	Контроль	30 (8; 39)	2,3713; p=0,0177
	ХВГС	8 (1; 29)	

Изменения показателей иммунограммы больных ХВГС характеризовались повышением количества лимфоцитов ($p=0,0013$), субпопуляций T-cell ($p=0,0301$), T-help ($p=0,0183$) при отсутствии увеличения T-killer, что свидетельствует о наличии воспалительного процесса в печени. Повышенным оказался и иммунорегуляторный индекс (CD4+/CD8+), который свидетельствует о высоком пролиферативном ответе T-клеток на вирусные антигены и подтверждает прогрессирование воспалительных изменений в печени. Одновременно с этим, у подавляющего количества больных ХВГС регистрировалось значительное снижение количества активированных T-хелперов ($p=0,0398$) и активированных T-киллеров ($p=0,0293$), что свидетельствует о наличии нарушений в активации T-лимфоцитов и приводит к неадекватности T-клеточного ответа на хроническую HCV-инфекцию. Установлено трехкратное уменьшение процента и количества субпопуляций лимфоцитов NK-cell ($p=0,0009$) и T-NK-cell ($p=0,0074$) по сравнению с контролем, что подтверждает нарушение их активации и неполноценное участие этого звена в антителозависимом клеточно-опосредованном цитолизе.

Подтверждением полученных данных служит выявленное снижение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных ХВГС:

9,54 ± 0,66 % при норме 14,0 ± 1,0 % (p<0,001), такое снижение присутствовало у 78,6 % обследованных пациентов.

На нижней границе нормы регистрировался показатель среднего числа тромбоцитов, вступивших в контакт с лимфоцитами – 2,73 ± 0,16; показатель ЛТИ оказался ниже нормы в 51,9 % случаев (табл. 3).

Таблица 3

Отклонения от нормы показателей ЛТА и ЛТИ у больных ХВГС (n=74)

Показатель	Норма	Распределение, в %		
		ниже нормы	норма	выше нормы
ЛТА, %	14,0 ± 1,0	78,6	12,5	8,9
ЛТИ	3,0 ± 0,3	51,9	25,0	23,1

Выявленные изменения показателя ЛТА подтверждают присутствующую у больных ХВГС дисфункцию Т-лимфоцитов, которая проявляется, в том числе, уменьшением их способности к адгезии тромбоцитов. Кроме того, это может свидетельствовать о внутрипеченочном накоплении Т-клеток, которые способствуют поддержанию процессов воспаления и фиброзирования в печени. Сами тромбоциты также могут быть вовлечены в иммунологические процессы, они, вероятно, привлекают Т-клетки в печень во время ее повреждения при ХВГС. Продолжением установленных фактов стало исследование иммуногенетических аспектов патогенеза ХВГС.

3. Состояние клеточного иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при ХВГС в зависимости от носительства SNP генов рецептора CD14, Toll-like-рецепторов и β-дефензинов

Установлено снижение содержания популяций активированных Т-лимфоцитов и активированных Т-киллеров у носителей генотипов С/Т (p=0,03 и p=0,04 соответственно) и Т/Т (p=0,02 и p=0,03 соответственно) полиморфизма CD14 (С-159Т), в сравнении с их количеством у носителей генотипа С/С (рис. 1-2). Это указывает, что мутантная аллель Т вносит весомый вклад в нарушение активации Т-лимфоцитов и приводит к неадекватности Т-

клеточного ответа на хроническую HCV-инфекцию. Описанные изменения, вероятно, способствуют ускользанию вируса от иммунного ответа, так как киллерные популяции играют ведущую роль в его элиминации, вызывая гибель инфицированных клеток.

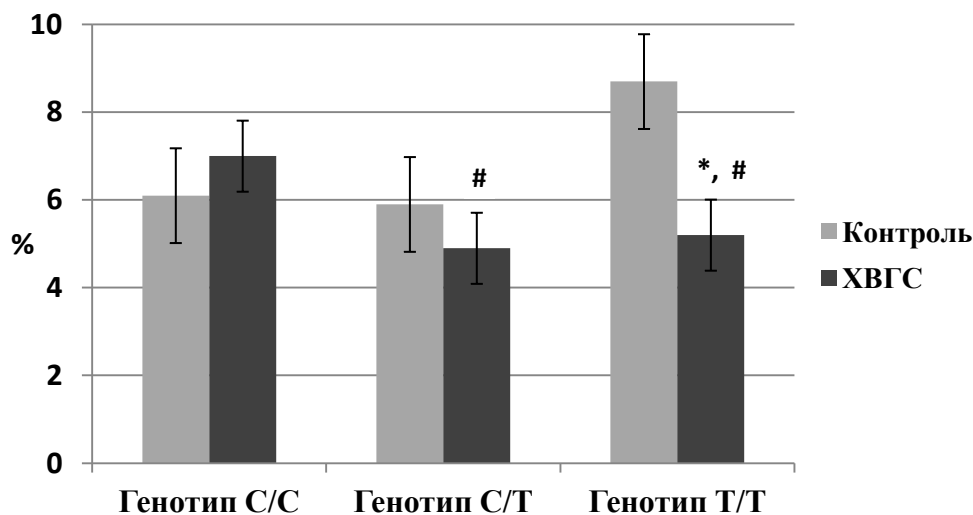


Рис. 1. Содержание T-cellAktiv у больных ХВГС в зависимости от носительства SNP CD14 (C-159T) (Me, 25-75%)

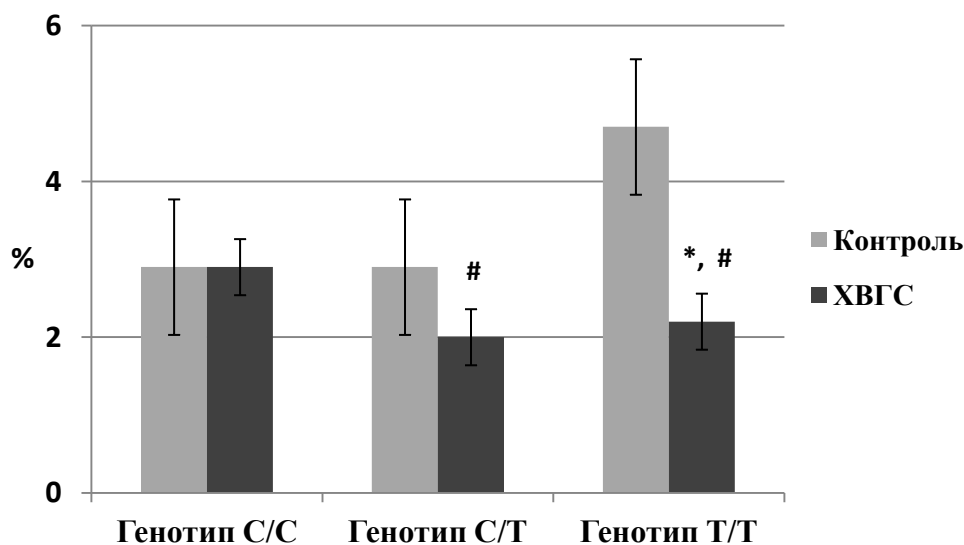


Рис. 2. Содержание T-killerAktiv у больных ХВГС в зависимости от носительства SNP CD14 (C-159T) (Me, 25-75%)

Примечание: критерий Манна-Уитни; * – статистическая значимость различий с контрольной группой, # – статистическая значимость различий с гомозиготой C/C.

При носительстве генотипа Пе/Пе полиморфизма TLR4 (Thr399Pе) у больных ХВГС установлено увеличение содержания популяций активированных Т-лимфоцитов ($p=0,03$), активированных Т-хелперов ($p=0,04$),

активированных Т-киллеров ($p=0,03$) и Т-НК-клеток ($p=0,03$), в сравнении с генотипами Thr/Thr и Thr/Ile (рис. 3).

Это сопровождается увеличением в 2 раза показателя ЛТА при носительстве генотипа Ile/Ile ($p=0,04$) (рис. 4). Можно предположить, что наличие генотипа Ile/Ile полиморфизма TLR4 (Thr399Ile) при ХВГС способствует поддержанию чрезмерной воспалительной реакции в печени посредством увеличения содержания Т-НК-клеток и последующего вовлечения Т-лимфоцитов и макрофагов в иммуноопосредованное воспаление.

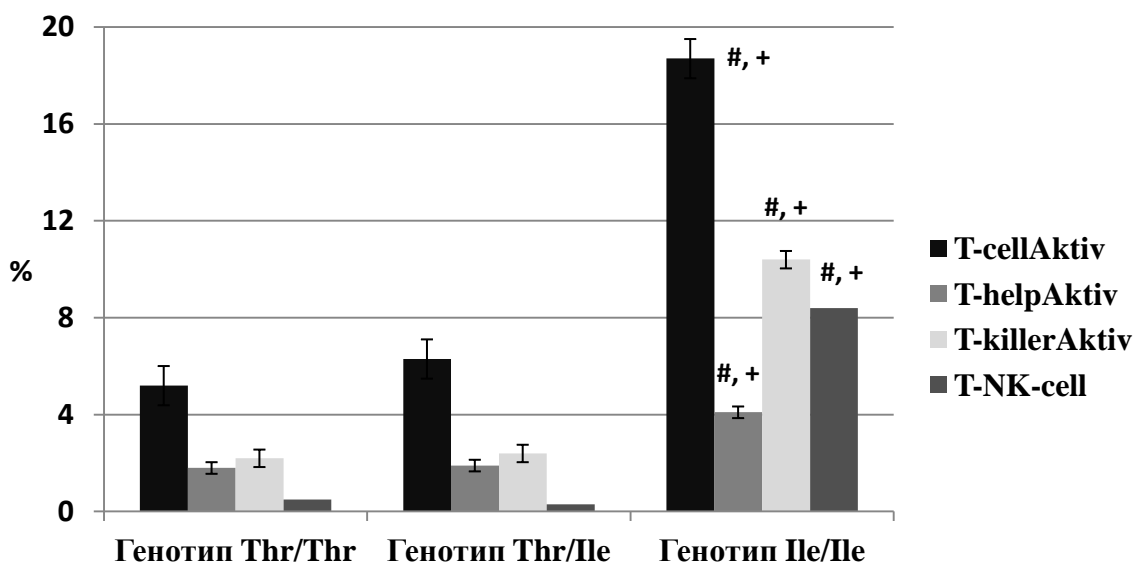


Рис. 3. Содержание Т-cellAktiv, Т-helpAktiv, Т-killerAktiv, Т-НК-cell у больных ХВГС в зависимости от носительства SNP TLR4 (Thr399Ile) (Me, 25-75%)

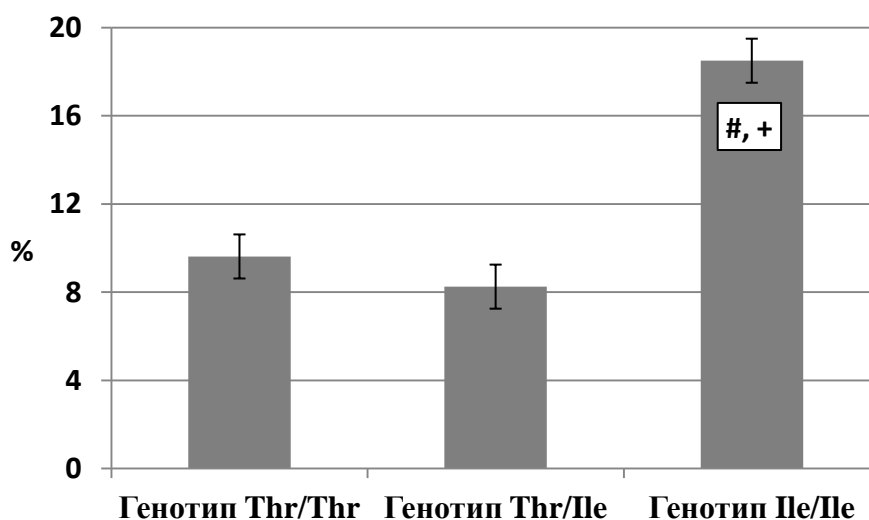


Рис. 4. Значение показателя ЛТА у больных ХВГС в зависимости от носительства SNP TLR4 (Thr399Ile) ($M \pm m$)

Примечание: критерий Манна-Уитни; # – статистическая значимость различий с гомозиготой Thr/Thr, + – статистическая значимость различий с гетерозиготой Thr/Ile.

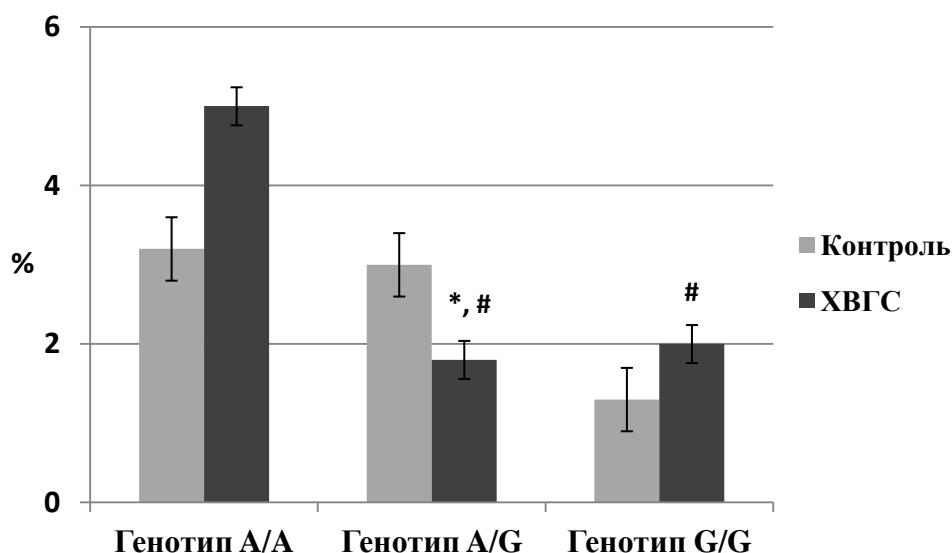


Рис. 5. Содержание T-helpAktiv у больных ХВГС в зависимости от носительства SNP TLR9 (A2848G) (Me, 25-75%)

Примечание: критерий Манна-Уитни; * – статистическая значимость различий с контрольной группой, # – статистическая значимость различий с гомозиготой A/A.

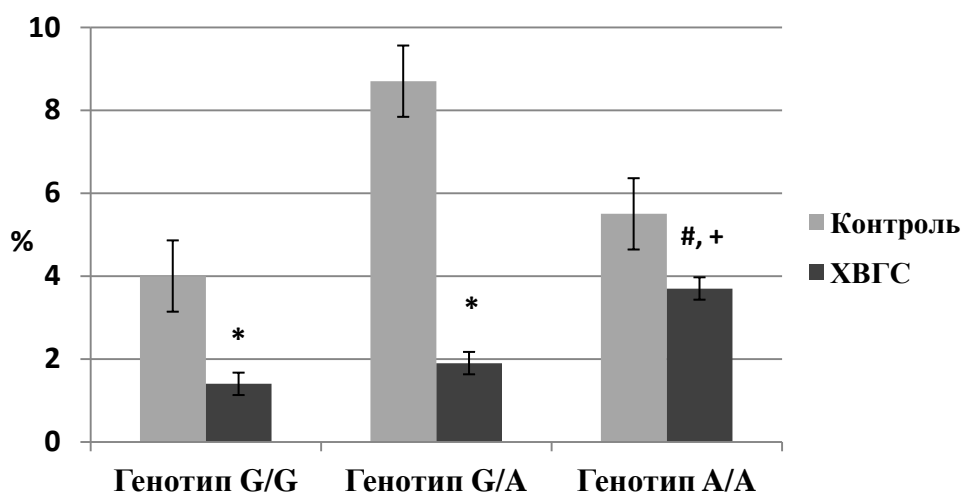


Рис. 6. Содержание NK-cell у пациентов с ХВГС в зависимости от носительства SNP DEFB1 (G-20A) (Me, 25-75%)

Примечание: критерий Манна-Уитни; * – статистическая значимость различий с контрольной группой, # – статистическая значимость различий с гомозиготой G/G, + – статистическая значимость различий с гетерозиготой G/A.

Выявлено, что у пациентов с хронической HCV-инфекцией при носительстве генотипов A/G и G/G полиморфизма TLR9 (A2848G), в сравнении с носителями генотипа A/A, отмечалось снижение числа активированных Т-хелперов ($p=0,04$) (рис. 5). Вероятно, мутантная аллель G вносит вклад в снижение активации Т-лимфоцитов при ХВГС, и, следовательно, приводит к неадекватности Т-клеточного ответа на хроническую HCV-инфекцию.

Носители генотипа А/А мутации DEFB1 (G-20A), в сравнении с носителями генотипов G/G и G/A, характеризовались только увеличением содержания НК-клеток ($p=0,03$) до уровня, не отличимого от контрольных значений (рис. 6). Можно предполагать, что генотип А/А оказывает благоприятное влияние на ряд показателей иммунограммы в условиях хронической HCV-инфекции.

Таким образом, носительство SNP CD14 (C-159T), TLR4 (Thr399Ile), TLR9 (A2848G) и DEFB1 (G-20A) оказывает существенное влияние на состояние клеточного иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию при хроническом вирусном гепатите С.

При этом общим иммунопатогенетическим звеном ХВГС является ось: гены рецептора CD14, TLR4 и TLR9, DEFB1 – Т-клеточный иммунный ответ – лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия.

4. Модель индивидуального прогнозирования развития ХВГС у клинически здоровых лиц на основе анализа изучаемых SNP генов иммунорегуляторных молекул

Модель с максимальной сбалансированной точностью (87 %), чувствительностью (80 %), специфичностью (94 %) и воспроизводимостью результата 10/10 представляет собой комбинацию полиморфных вариантов генов CD14 (C159T), DEFB1 (G-20A) и TLR9 (A2848G) ($\chi^2=5,12$; $p=0,02$, OR=38,7), увеличивающая риск развития хронического вирусного гепатита С в 17,5 раз (табл. 4).

Таблица 4

Модель Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) для прогнозирования хронического вирусного гепатита С

Модель	Баланс точности кроссвалидации подготовки	Баланс точности кроссвалидации тестирования	Взаимо-согласованность кроссвалидации
CD14 (C159T), DEFB1 (G-20A), TLR9 (A2848G)	0,8716	0,8026	10/10

В результате моделирования взаимодействий исследуемых генов выявлены сочетания полиморфных вариантов, ассоциированные с риском развития ХВГС: -159СТ CD14/-20AA DEFB1/-2848GA TLR9; -159СТ CD14/-20AA DEFB1/-2848GG TLR9; -159СТ CD14/-20GA DEFB1/-2848GG TLR9; -159ТТ CD14/-20GG DEFB1/-2848AA TLR9; -159ТТ CD14/-20AA DEFB1/-2848AG TLR9; -159ТТ CD14/-20AA DEFB1/-2848GG TLR9; -159ТТ CD14/-20AA DEFB1/-2848AA TLR9; -159ТТ CD14/-20GG DEFB1/-2848AG TLR9; -159ТТ CD14/-20GG DEFB1/-2848AA TLR9; -159СС CD14/-20AA DEFB1/-2848AG TLR9; -159СС CD14/-20GG DEFB1/-2848AA TLR9.

При этом имеются и протективные комбинации генов, максимально снижающие риск возникновения хронического вирусного гепатита С: -159СТ CD14/-20GA DEFB1/-2848AA TLR9; -159СТ CD14/-20GG DEFB1/-2848AA TLR9; -159СС CD14/-20GA DEFB1/-2848AA TLR9.

Полученные данные полностью подтверждают значение исследуемых SNP в иммунопатогенезе ХВГС, а их определение может использоваться в диагностическом процессе на доклинической стадии заболевания для повышения достоверности прогнозирования развития ХВГС, что положительно скажется на лечебно-профилактических и диагностических мероприятиях при данном инфекционном процессе.

Влияние изученной генетической составляющей на клеточный иммунный ответ представлено на рисунке 7.

Таким образом, результаты исследования существенно дополняют фундаментальные сведения об иммуногенетической компоненте предрасположенности к хронизации вирусного гепатита С, когда различные генетические варианты иммунорегуляторных молекул обеспечивают индивидуальное реагирование иммунной системы при инфицировании вирусом гепатита С. В результате, сниженная неспецифическая противовирусная защита организма в условиях дисрегуляции клеточного иммунитета выступает прогностически неблагоприятным признаком дальнейшего течения

заболевания. Полученные сведения позволяют персонифицировать диагностику, прогнозирование, а в недалеком будущем – и лечение ХВГС.

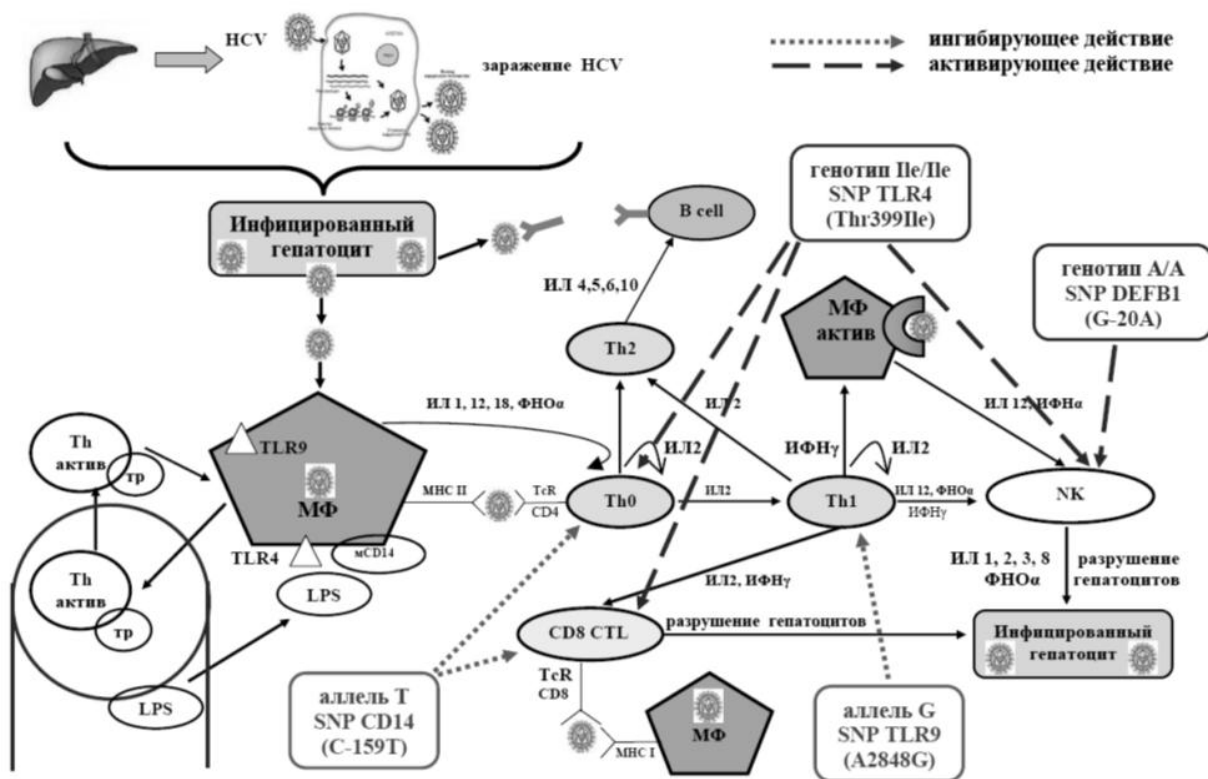


Рис. 7. Влияние генетической составляющей на клеточный иммунный ответ при хроническом вирусном гепатите С

ВЫВОДЫ

1. У больных хроническим вирусным гепатитом С аллель Т и генотип ТТ полиморфизма гена CD14 (C-159T) встречается чаще, чем у здоровых лиц. Наличие аллеля Т увеличивает риск развития ХВГС в 5 раз по сравнению с носительством аллели С SNP CD14 (C-159T).
2. Генотип Ille/Ile полиморфизма TLR4 (Thr399Ile) повышает риск развития ХВГС у его обладателей в 4,6 раза.
3. У пациентов с ХВГС чаще, чем у здоровых лиц обнаруживается аллель G и генотип G/G полиморфизма гена TLR9 (A2848G). Присутствие аллели G в 4,3 раза увеличивает риск развития ХВГС, по сравнению с носителями аллеля А гена TLR9 (A2848G).
4. Распространенность генотипа А/А полиморфизма гена дефензина бета 1 (G-20A) у больных ХВГС в 2,4 раза, аллели А в 1,4 раза выше, чем у

здоровых. Риск развития ХВГС у носителей аллели А в 3,2 раза выше, чем аллели G SNP гена дефензина $\beta 1$ (G-20A).

5. Хроническое течение HCV-инфекции характеризуется снижением количества активированных Т-хелперов, активированных Т-киллеров, НК-клеток и Т-НК-клеток и снижением лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии.

6. Носительство SNP генов иммунорегуляторных молекул оказывает влияние на содержание иммунокомпетентных клеток у больных ХВГС. Аллель Т и генотипы Т/Т, С/Т SNP CD14 (C-159T) ассоциируются со снижением популяции активированных Т-лимфоцитов и активированных Т-киллеров. Генотип Пе/Пе полиморфизма TLR4 (Thr399Ile) сопряжен с увеличением содержания активированных Т-лимфоцитов, активированных Т-киллеров, Т-НК клеток и повышением лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. У носителей аллели G и генотипов G/G, A/G SNP TLR9 (A2848G) снижается число активированных Т-хелперов. Присутствие генотипа А/А SNP гена дефензина $\beta 1$ (G-20A) сопровождается увеличением содержания НК-клеток до контрольных значений.

7. Общим иммунопатогенетическим звеном хронического вирусного гепатита С является ось: гены рецептора CD14, TLR9 – недостаточный Т-клеточный иммунный ответ – низкая лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия.

8. Разработана MDR-модель прогнозирования развития хронического вирусного гепатита С, в соответствии с которой рисковыми комбинациями является сочетание отдельных SNP генов CD14 (C159T), DEFB1 (G-20A), TLR9 (A2848G).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ:

1. Сахарова Д.А. Состояние клеточного иммунитета при хроническом вирусном гепатите С в зависимости от некоторых клинических характеристик / Д.А. Сахарова, Ю.А. Витковский, П.П. Терешков // Врач-аспирант. – 2013. – № 6.3 (61). – С. 481-488.

2. Сахарова Д.А. Клеточный иммунитет у больных хроническим вирусным гепатитом С / Д.А. Сахарова, Ю.А. Витковский, П.П. Терешков // Дальневосточный медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 21-24.

3. Сахарова Д.А. Генетический полиморфизм С-159Т гена рецептора CD4 у больных хроническим вирусным гепатитом С / Д.А. Сахарова, А.В. Марковский, Ю.А. Витковский // Забайкальский медицинский вестник : Электронное научное издание. – 2015. – № 3. – С. 61-66.

4. Сахарова Д.А. Генетический полиморфизм Toll-рецепторов у больных хроническим вирусным гепатитом С в Забайкальском крае / Д.А. Сахарова, Ю.А. Витковский // Молекулярная медицина. – 2016. – Том 14, № 2. – С. 30-34.

5. Сахарова Д.А. Распространенность полиморфизмов гена Дефензина-β-1 (G-20A; G-52A) среди больных хроническим вирусным гепатитом С в Забайкальском крае / Д.А. Сахарова, А.В. Марковский, Ю.А. Витковский // Забайкальский медицинский вестник : Электронное научное издание. – 2017. – № 4. – С. 118-123.

Работы, опубликованные в сборниках трудов и материалах конференций:

6. Особенности клеточного иммунитета при хроническом гепатите С / Д.А. Сахарова, Ю.А. Витковский, П.П. Терешков [и др.] // Материалы V ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням, 25-27 марта 2013 г. – Москва, 2013. – Т. 11, Прил. № 1. – С. 358.

7. Vitkovsky Yu. Lymphocyte-Platelet Adhesion in patients with chronic viral hepatitis C / Yu. Vitkovsky, D. Sakharova, A. Petrov // XXIV Congress of the international society on thrombosis and haemostasis, June 29-July 4 2013. – Amsterdam, 2013. – P. 371.

8. Показатели клеточного иммунитета у больных хроническим вирусным гепатитом С при разной длительности заболевания / Д.А. Сахарова, Ю.А. Витковский, А.Н. Емельянова, Л.Б. Кижло // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины : материалы Всероссийской

научно-практической конференции с международным участием, посвященной 60-летию Читинской государственной медицинской академии, 17-18 октября 2013 г. – Чита, 2013. – Т. 2. – С. 154-156.

9. Сахарова Д.А. Частота полиморфизмов генов Toll-рецепторов у больных хроническим вирусным гепатитом С / Д.А. Сахарова, А.В. Марковский, Ю.А. Витковский // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию Читинской государственной медицинской академии, 25 октября 2018 г. – Чита, 2018. – С. 202-204.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CD – кластер дифференцировки антигенов

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

TLR – toll-like receptor – toll-подобные рецепторы

ЛТА – лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия

ОР – относительный риск заболевания

ОШ (OR) – отношение шансов

ХВГС – хронический вирусный гепатит С

ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты

CI – доверительный интервал

HCV – вирус гепатита С

Lymphocytes – лимфоциты

MDR – метод многофакторного уменьшения размерности

T-cell – Т-клетки

T-help – Т-хелперы

T-killer – Т-киллеры