

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ И НК-КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

М.С. Селькова¹, А.В. Селютин², С.А. Сельков²

¹ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

²ФГБУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Резюме. Характер течения вирусного гепатита С во многом зависит от состояния иммунной системы пациента. При иммунологическом исследовании больных с хроническим гепатитом С было показано, что в зависимости от вирусной нагрузки и генотипа вируса изменяется соотношение между содержанием Т-регуляторных клеток и активированных НК-клеток. У пациентов с высокой вирусной нагрузкой отмечено изменение этого соотношения в сторону превалирования Т-регуляторных лимфоцитов.

Ключевые слова: гепатит С, НК-клетки, Т-регуляторные клетки.

PATTERNS OF REGULATORY T-CELLS AND NK-CELLS LEVELS IN PATIENTS WITH HEPATITIS C VIRUS INFECTION

Selkova M.S., Selutin A.V., Selkov S.A.

Abstract. The clinical course of hepatitis C virus infection partially depends on the patient's immune system status. It was shown that balance between levels of regulatory T-cells and activated NK-cells changed depending on viral load and virus genotype. Patients with high viral load demonstrated shift of this balance toward regulatory T-cells increasing. (*Infect. immun.*, 2012, vol. 2, N 4, p. 715–722)

Key words: hepatitis C, NK-cells, Treg cells.

Введение

Проблема вирусных гепатитов является одной из ключевых в современной инфектологии. При этом особое внимание привлекает вирусный гепатит С, так как возбудителем этого заболевания инфицировано приблизительно 500 млн человек во всем мире, из которых умирает ежегодно 350 тысяч. Кроме того, чрезвычайно высока вероятность хронизации заболевания (до 80%), а также развития первичной гепатокарциномы (20%) [3, 4].

В последнее время интенсивно обсуждается роль иммунной системы в механизмах хронизации гепатита С, а также влияние особенностей иммунного ответа на эффективность противо-

вирусной терапии. Как и при многих других вирусных инфекциях, при хроническом гепатите С основными факторами, определяющими иммунорезистентность, являются цитотоксические Т-лимфоциты, НК-клетки и система интерферонов.

При хроническом течении гепатита С происходят изменения в субпопуляционном составе иммунокомпетентных клеток и их функциональной активности. Так, например, кроме дисбаланса Т-хелперных клеток (Th), меняется содержание и активность цитотоксических лимфоцитов, Т-регуляторных клеток, спектр продуцируемых ими цитокинов [1, 14, 15].

К настоящему времени не вызывает сомнения роль натуральных киллеров (НК-клеток)

поступила в редакцию 16.07.2012
отправлена на доработку 21.08.2012
принята к печати 03.09.2012

© Селькова М.С. и соавт., 2012

Адрес для переписки:

Селькова Мария Сергеевна,
отделение экспериментальной терапии
хронических вирусных гепатитов
ФГБУ НИИ гриппа МЗиСР РФ

197376, Санкт-Петербург,
ул. Проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа МЗиСР РФ.
Тел.: +7 921 323-69-24 (моб.).
E-mail: selkovams@mail.ru

в противовирусном иммунитете. Они выступают не только как важный компонент врожденного иммунитета, но и участвуют, благодаря секреторной активности, в регуляции адаптивных иммунных реакций.

Натуральные киллеры (NK) составляют от 5 до 15% от общей популяции лимфоцитов периферической крови [8]. NK-клетки можно подразделить на 2 субпопуляции: NK-клетки, экспрессирующие преимущественно CD16 и экспрессирующие в большей степени CD56. При этом первые обладают более выраженной цитотоксической активностью, а вторые выполняют в основном регуляторные функции [20].

Функциональная активность NK-клеток реализуется как посредством прямой цитотоксической активности (цитоллиз инфицированных клеток за счет выделения гранзимов и перфоринов), так и благодаря продукции цитокинов, например, синтез γ -интерферона способствует торможению репликации вируса и активирует макрофаги печени [17].

Данные литературы свидетельствуют о том, что при хроническом гепатите С у пациентов отмечается снижение продукции γ -интерферона NK-клетками [25]. Вместе с тем, существуют данные, указывающие на то, что при хроническом гепатите С не наблюдается изменений в количестве NK-клеток и их функциональной активности [10].

Одной из характеристик функциональной активности NK-клеток может служить экспрессия на их поверхности так называемого LAMP-белка (Lysosomal associated membrane protein, CD107a). LAMP-белок представляет собой гликопротеин, экспрессируемый на мембране лизосомальных гранул. В случае активации клеток и развивающейся в этой связи дегрануляции происходит экстернализация этого белка с последующей его экспрессией на мембране активированных клеток [7].

Важную роль в регуляции интенсивности иммунного ответа, в том числе цитотоксических реакций и продукции цитокинов играют Т-хелперные лимфоциты (Th).

В настоящее время, в зависимости от продуцируемого ими спектра цитокинов Th-клетки, в свою очередь, подразделяют на Th 1, 2, 9, 17 типов, а также фолликулярные Th и Т-регуляторные лимфоциты (Treg).

Первоначально, в 1980-х гг., было показано существование Th1 и Th2. Th1 является источником $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и IL-2, а Th2 продуцируют IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13 [19]. Функциональная активность Th1 клеток направлена на инициацию и поддержку реакций клеточного иммунитета, в то время как Th2 способствуют развитию гуморального иммунного ответа. Дальнейшие исследования показали существование еще одного типа Th-клеток, а именно Th17, кото-

рые продуцируют такие цитокины, как IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22, играют важную роль в защите организма от внеклеточных бактерий и грибков и связаны с патогенезом многих аутоиммунных заболеваний [18, 25]. Т-хелперы 9-го типа характеризуются способностью к синтезу IL-9 и IL-10 и ассоциированы с опосредованным Th2 иммунным ответом; клетки этого типа не способны к продукции IL-4 и IL-5 [27]. В отличие от рассмотренных выше типов Th-клеток, активность которых направлена на развитие иммунного ответа в том или ином направлении, Т-регуляторные лимфоциты (Treg) были впервые описаны как клетки, обеспечивающие иммунологическую толерантность к собственным антигенам, ограничивающие активность как эффекторных, так регуляторных иммунокомпетентных клеток [21]. Кроме индуцибельных Т-регуляторных лимфоцитов (iTreg), дифференцирующихся из Th0 клеток после презентации антигена, существуют так называемые естественные Т-регуляторные клетки (nTreg), дифференцирующиеся непосредственно в тимусе и обладающие сходным с iTreg репертуаром экспрессируемых на их поверхности антигенов и эффекторных молекул. Как индуцибельные, так и естественные Т-регуляторные клетки экспрессируют на своей поверхности молекулы CD4 и CD25 и содержат фактор транскрипции FOXP3 [11].

Так как определение внутриклеточных белков, в частности FOXP3, требует дополнительных этапов пробоподготовки, при исследовании клинических образцов используют комбинированную окраску поверхностных антигенов. При этом в настоящее время Т-регуляторные лимфоциты определяют как клетки с иммунофенотипом $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low}$ [11].

Чаще всего принято считать, что именно Т-регуляторные лимфоциты, обладающие иммунофенотипом $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low}$, оказывают основной супрессивный эффект на развитие иммунного ответа. К основным функциям Т-регуляторных лимфоцитов относят подавление функциональной активности таких клеток как Т-хелперы, натуральные киллеры, дендритные клетки, моноциты и цитотоксические Т-лимфоциты [29]. В результате подавления активности этих клеток происходит снижение секреции IL-2 и γ -интерферона [12].

Показано, что Т-регуляторные клетки могут реализовывать свой супрессорный эффект посредством секреции $TGF\beta$ и экспрессии его на клеточной мембране, а также в результате межклеточных контактов [16].

Т-регуляторные клетки, как и все Т-клетки, обладают Т-клеточным рецептором (TCR), который позволяет узнавать антигены в комплексе с МНС [9]. Это подразумевает, что данный процесс является антиген-специфичным [23, 24, 28].

Иммуносупрессия, обусловленная Т-регуляторными клетками, может способствовать персистенции возбудителя в организме при вирусных инфекциях. В частности, было показано увеличение количества Т-регуляторных клеток в периферической крови больных с хроническим гепатитом С, по сравнению с аналогичными образцами пациентов, у которых инфекция завершилась элиминацией вируса и выздоровлением [6, 22]. Кроме того, было показано, что Т-регуляторные клетки подавляют функциональную активность вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов при гепатите. Это позволило предположить, что они играют центральную роль в персистенции вирусов и могут быть целью иммунотерапии при хроническом гепатите С [5].

В то же время, недостаточное влияние Т-регуляторных клеток может приводить к неконтролируемому цитолитическому синдрому в результате повышенной активности НК-клеток и, как следствие, к быстрому прогрессированию хронического вирусного гепатита С. Вопросам взаимодействия между Т-регуляторными лимфоцитами и НК-клетками посвящены немногочисленные работы. Так в работе М. Giroux и соавт. показано, что Т-регуляторные лимфоциты угнетают дифференцировку предшественников НК-клеток в зрелые клетки [13]. Не изучены механизмы влияния Т-регуляторных клеток на функциональную активность НК-клеток, в том числе при конкретных вирусных инфекциях. В связи с этим нами была предпринята попытка изучения соотношения между популяциями этих клеток у больных с различными клинико-вирусологическими формами хронического гепатита С.

Материалы и методы

В исследование было включено 86 пациентов: 53 мужчины (63,8%) и 33 женщины (36,2%) в возрасте от 20 до 62 лет (Me [30/42]), обратившихся в клинику экспериментальной терапии хронических вирусных гепатитов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития РФ с диагнозом хронический гепатит С.

Определение суммарных антител к вирусу гепатита С проводили с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа на тест-системах фирмы «Вектор» (Россия). Результаты реакции ИФА оценивали на микропланшетном спектрофотометре «ELx 800» (Biotek, США).

Выявление РНК вируса в крови с определением генотипа и вирусной нагрузки проводили методом real-time ПЦР с использованием наборов «Амплиценс» (Россия) на амплификаторе «Stratogene» (США).

Иммунологическое обследование пациентов с хроническим гепатитом С включало определе-

ние относительного и абсолютного содержания НК-клеток, характеризующихся по фенотипу CD3⁻CD16⁺CD56⁺ и Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127^{low} методом проточной цитометрии. В составе популяции НК-клеток отдельно определяли содержание клеток, несущих CD107a, экспрессирующегося на их поверхности при активации. Кровь для исследования забирали после пункции кубитальной вены.

Определение содержания НК-клеток. Образец периферической крови (200 мкл) инкубировали с 20 мкл смеси моноклональных антител к антигенам CD3, CD16, CD56, CD107a, конъюгированных с перидин хлорофиллом (PerCP), фикоэритрином (PE) и изотиоцианатом флюоресцеина (FITC) (BD, США), при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин, добавляли 1,8 мл лизирующего раствора и встряхивали. После этого образец инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин. Характер флюоресценции оценивали при помощи проточного цитофлуориметра «FACS Canto II» (BD, США). Для этого проводили гейтирование лимфоцитов в координатах прямого и бокового светорассеяния FSC — SSC. Среди событий из гейта лимфоцитов НК-клетки выделяли по фенотипу CD3⁻CD16⁺CD56⁺. Затем оценивали количество НК-клеток периферической крови, экспрессирующих CD107a (CD3⁻CD16⁺CD56⁺CD107a⁺).

С целью определения нормальных значений различных популяций НК-клеток была исследована кровь 24 здоровых доноров, из них 17 мужчин, 7 женщин. Нормальные значения составили: NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) — 4,2–25,3% (0,095–0,640 млн/мл), NK, экспрессирующие CD107a — 0,5–2% (0,000495–0,0019 млн/мл). Процентное отношение рассчитывали от общего количества лимфоцитов.

Определение содержания Т-регуляторных лимфоцитов. К образцу периферической крови (200 мкл) добавляли по 15 мкл раствора смеси моноклональных антител к дифференцировочным антигенам: CD4, CD25, CD127, конъюгированных с FITC, аллофикоцианином (APC) и PE соответственно. Образец инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин, добавляли 1,8 мл лизирующего раствора и встряхивали. Далее образец инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин. При цитометрическом исследовании на проточном цитометре «FACSCanto II» (BD, США) накапливали данные о 50 000 событий. На точечном графике в координатах бокового светорассеяния и интенсивности флюоресценции FITC определяли локализацию Т-лимфоцитов с иммунофенотипом CD4⁺. Данную область выделяли и анализировали с помощью точечного графика в координатах интенсивности флюо-

ресценции APC и PE, при этом определяли относительное содержание клеток с иммунофенотипом CD25^{hi}CD127^{low}, которые и представляли собой T-регуляторные клетки [2].

С целью определения нормальных значений содержания T-регуляторных клеток была исследована кровь 20 здоровых доноров, из них 9 мужчин, 11 женщин. Нормальные значения составили: 2,4–6,9% от общего количества CD4⁺ T-лимфоцитов (0,03–0,08 млн/мл).

Статистическая обработка полученных данных была проведена с применением пакетов программ SPSS 17,0. Характеристики выборок представлены в виде средних величин и стандартных отклонений среднего. Сравнительный анализ результатов вычисляли при помощи U-теста Манна–Уитни для независимых выборок. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

Результаты

При анализе этиологической структуры вирусного гепатита С были получены следующие данные. В зависимости от генотипа вируса пациенты распределились следующим образом: 1a генотип встречался у 2 пациентов (2,56%), 1b генотип — у 41 (52,56%), 2 генотип — у 3-х (3,84%), 3a генотип регистрировался у 29 пациентов (37,17%), сочетание 2-х генотипов было отмечено у 3 пациентов (3,84%); 1b и 1a — у 2-х пациентов, сочетание 1b и 3a у одного пациента. Выявленная структура частоты различных генотипов в целом соответствует большинству данных, полученных при обследовании пациентов в Российской Федерации.

Уровень вирусной нагрузки был определен у 71 пациента. У 42 человек (59,15%) количество копий РНК вируса гепатита С (ВГС) в крови характеризовалось как высокое (> 800 000 МЕ/мл, Me — 2 520 000 МЕ/мл). Соответственно, у 29 пациентов (40,85%) уровень вирусной нагрузки оценивался как низкий (< 800 000 МЕ/мл, Me — 210 000 МЕ/мл).

Нами было установлено, что средняя величина относительного содержания NK-клеток

с фенотипом CD3⁻CD16⁺CD56⁺ у больных хроническим гепатитом С составила 12,4±4,53% (0,731±0,328 млн/мл). Нормальные показатели выявлены у 67 человек (95,7%), показатели выше нормы — у 1 пациента (1,4%) и у двух пациентов (2,9%) они были ниже нормы.

При изучении содержания NK-клеток с фенотипом CD3⁻CD16⁺CD56⁺CD107a⁺ выявлено, что только у 8 (11,4%) пациентов уровень этих клеток находился в пределах нормальных значений. У 62 человек (88,6%) содержание активированных NK-клеток было ниже нормы, и медиана составила 0,26±0,21% (0,0019±0,0020 млн/мл).

Известно, что в клинической практике длительность комбинированной противовирусной терапии определяется генотипом вируса гепатита С. Вирус гепатита С 1 генотипа более устойчив к применяемым препаратам и курс терапии составляет 48 недель, в то время как при 3 генотипе вируса гепатита С лечение назначается на 24 недели. В связи с этим мы провели сравнительный анализ содержания NK-клеток у больных, инфицированных вирусами гепатита С 1 и 3 генотипов. Было установлено, что суммарное количество NK-клеток в этих группах статистически значимо не различалось (критерий Манна–Уитни, $p > 0,05$): медиана у больных с 1 генотипом составляет 12,76±4,73%, а с 3 генотипом — 12,22±4,47%. При расчете абсолютного количества клеток существенных различий между пациентами, инфицированными вирусами 1 и 3 генотипов так же не было выявлено (0,71±0,30 и 0,74±0,37 млн/мл соответственно) (табл. 1).

Анализ данных показал, что содержание активированных NK-клеток с фенотипом CD3⁻CD16⁺CD56⁺CD107a⁺ у пациентов, инфицированных вирусом гепатита С 1 генотипа составило 0,30±0,26% (0,002±0,002 млн/мл), а 3 генотипа — 0,23±0,14% (0,002±0,001 млн/мл) (критерий Манна–Уитни, $p > 0,05$) (табл. 1).

Подобные данные были получены и при попытке связать уровень цитотоксических лимфоцитов и вирусной нагрузки. Результаты приведены в табл. 2.

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ NK И Treg КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТА С 1 И 3 ГЕНОТИПОВ (M±m)

Фенотип клеток	Референсные значения	Генотип 1 n = 41	Генотип 3 n = 29
NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺) (% от общего количества лимфоцитов)	4,2–25,3	12,76±4,73	12,22±4,47
NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺) (млн/мл)	0,095–0,640	0,71±0,30	0,74±0,37
NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD107a ⁺) (% от общего количества лимфоцитов)	0,5–2	0,30±0,26	0,23±0,14
NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD107a ⁺) (млн/мл)	0,000495–0,0019	0,002±0,002	0,002±0,001
Treg (CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{low}) (% от общего количества CD4 ⁺ лимфоцитов)	2,4–6,9	5,80±1,56	5,87±2,41
Treg (CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{low}) (млн/мл)	0,03–0,08	0,05±0,02	0,05±0,03

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ НК И Treg КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ (M±m)

Фенотип клеток	Референсные значения	Низкая нагрузка, n = 42	Высокая нагрузка, n = 29
NK (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) (% от общего количества лимфоцитов)	4,2–25,3	13,12±4,42	12,08±4,21
NK (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) (млн/мл)	0,095–0,640	0,86±0,34	0,67±0,29
NK (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD107a ⁺) (% от общего количества лимфоцитов)	0,5–2	0,23±0,15	0,28±0,25
NK (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD107a ⁺) (млн/мл)	0,000495–0,0019	0,002±0,001	0,002±0,001
Treg (CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{low}) (% от общего количества CD4 ⁺ лимфоцитов)	2,4–6,9	6,06±2,56	5,41±1,84
Treg (CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{low}) (млн/мл)	0,03–0,08	0,06±0,03	0,04±0,02

Полученные результаты свидетельствуют о тенденции к снижению количества активированных НК-клеток, несущих на своей поверхности активационный маркер CD107a, у пациентов с хроническим гепатитом С. Именно эти клетки ответственны за цитолиз инфицированных вирусом гепатоцитов, а значит при недостаточной их активности возможна длительная персистенция вирусов в клетках. Следует отметить, что содержание неактивированных НК-клеток, определяемых по экспрессии CD16⁺CD56⁺, находилось в пределах нормы. В связи с этим, при анализе содержания НК-клеток представляется необходимым определение их активационного маркера CD107a.

Данное исследование показало отсутствие зависимости содержания активных НК-клеток от вирусной нагрузки у пациентов и генотипа вируса.

В ходе изучения содержания Т-регуляторных лимфоцитов установить зависимость уровня данных клеток от вирусной нагрузки и генотипа вируса гепатита С также не удалось. Нами было установлено, что средняя величина относительного содержания Т-регуляторных клеток у пациентов с хроническим гепатитом С составила 5,65±2,06% (при референсных значениях 2,4–6,9%) (0,049±0,026 млн/мл) от общего количества CD4⁺ лимфоцитов. Нормальные показатели выявлены у 42 человек (73,68%), у 15 пациентов (26,3%) они были выше нормы.

У пациентов, инфицированных вирусом 1 генотипа, уровень Т-регуляторных лимфоцитов составил 5,80±1,56% (0,05±0,02 млн/мл), инфицированных вирусом 3 генотипа — 5,87±2,41% (0,05±0,03 млн/мл) (табл. 1). В зависимости от вирусной нагрузки различия в содержании Т-регуляторных клеток были незначительные (табл. 2).

Статистический анализ полученных данных не выявил достоверных различий исследуемых показателей ни в зависимости от генотипа вируса, ни в зависимости от вирусной нагрузки.

Результаты нашего исследования показали отсутствие существенных различий в содержа-

нии Т-регуляторных клеток и НК-клеток между различными группами пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. В связи с этим мы предприняли попытку оценки индивидуальных соотношений между уровнями Т-регуляторных и НК-клеток у пациентов с последующим сравнением этих показателей в разных группах.

С целью выявления взаимосвязи между содержанием Т-регуляторных клеток и активированных НК-клеток, мы ввели понятие иммуносупрессорный коэффициент (ИСК). ИСК представлял собой соотношение абсолютного содержания Т-регуляторных клеток и активированных НК-клеток.

При анализе ИСК с помощью критерия Манна–Уитни были выявлены достоверные ($p < 0,05$) различия значений данного показателя при сравнении пациентов с высокой и низкой вирусной нагрузкой, а также в зависимости от генотипа вируса (рис. 1, 2, табл. 3).

Полученные различия соответствовали и клиническим данным, свидетельствовавшим как о более интенсивном течении заболевания у больных с высокой вирусной нагрузкой, так и более высокой резистентности к противовирусной терапии у пациентов, инфицированных вирусом гепатита С 1 генотипа.

Обсуждение

Развитие иммунного ответа при вирусных инфекциях ассоциировано в первую очередь с активацией клеточных механизмов, в том числе цитотоксических клеток. Элиминация возбудителя при этом сопровождается гибелью клеток, пораженных вирусом. Этот процесс, особенно при вирусных инфекциях, связанных с развитием хронических форм заболевания, требует обязательного участия регуляторных компонентов иммунной системы. Именно регуляторные клетки могут определять тонкий баланс между активацией и подавлением цитотоксической функции различных клеточных популяций (в первую очередь НК-клеток).

При хроническом гепатите С нарушение этого баланса может приводить либо к длительному

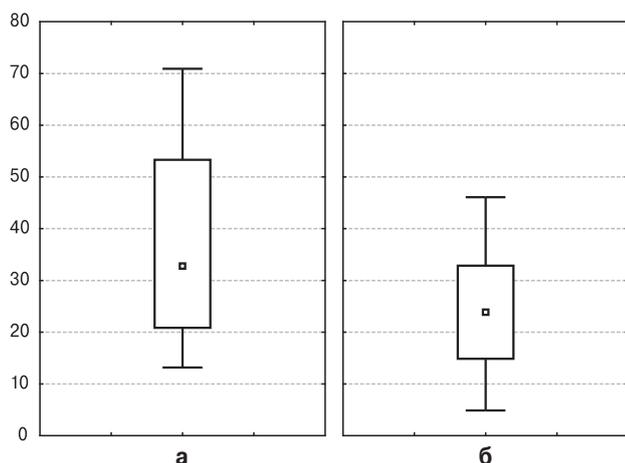


Рисунок 1. Значения ИСК при низкой (а, медиана 32,58) и высокой (б, медиана 22,28) вирусной нагрузке

валотекущему процессу, либо к бурной неконтролируемой гибели клеток. В первом случае избыточная супрессия заканчивается развитием первичного рака печени, а во втором, при ее недостатке, — интенсивным цитолитическим синдромом с последующим замещением функциональной ткани печени соединительной тканью и быстрым формированием цирроза печени, печеночной недостаточности.

Роль Т-регуляторных клеток традиционно оценивается с точки зрения их влияния на Т- и В-лимфоциты в процессе антигенной стимуляции и антителогенеза. Межклеточные взаимодействия при этом носят как непосредственный, контактный характер, так и опосредованный цитокинами (например, TGFβ) [16]. Значительно меньше информации о влиянии Т-регуляторных лимфоцитов на цитотоксические клетки, в частности НК-клетки. Имеющиеся в литературе немногочисленные данные свидетельствуют о том, что Т-регуляторные клетки могут оказывать влияние как на дифференцировку НК-клеток, препятствуя их превращению в зрелые цитотоксические клетки (НК-клетки), так и на их функциональную активность [13].

В настоящей работе мы не ставили задачи уточнения механизмов взаимодействия Т-регуляторных и НК-клеток. Вместе с тем, полученные в ходе исследования данные о содер-

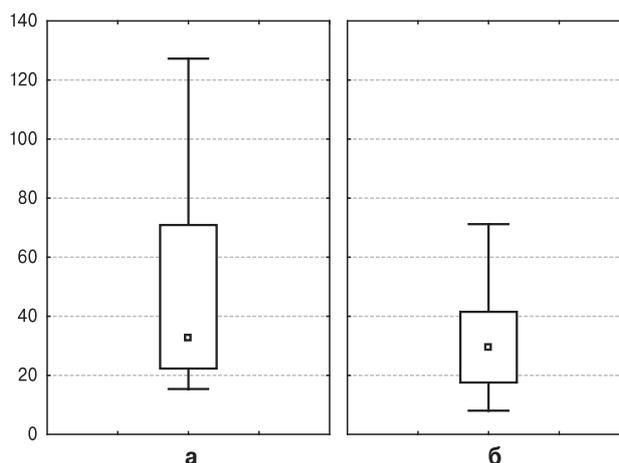


Рисунок 2. Значения ИСК при инфицировании вирусом гепатита С с генотипом 1 (а, медиана 30,6) и 3 (б, медиана 29,64)

жании Т-регуляторных клеток и активированных НК-клеток свидетельствуют о возможном регулирующем влиянии Т-регуляторных лимфоцитов на дифференцировку и активацию НК-клеток в ходе инфекционного процесса при хроническом гепатите С.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для иммунологической характеристики инфекционного процесса при хроническом гепатите С определение отдельных популяций иммунокомпетентных клеток является малоинформативным. Нам не удалось найти существенных различий в содержании как Т-регуляторных лимфоцитов, так и НК-клеток у пациентов с различными формами и вариантами течения хронического гепатита С.

В ходе исследования были отмечены лишь тенденции к снижению относительного количества активированных НК-клеток у пациентов с хроническим гепатитом С независимо от молекулярно-биологических характеристик вирусного процесса.

В то же время индивидуальный анализ показал, что уменьшение содержания активированных НК-клеток с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD107a⁺ имеется у большей части (88,6%) пациентов с хроническим гепатитом С.

Это свидетельствует о необходимости оценки не только содержания отдельных популяций

ТАБЛИЦА 3. МЕДИАННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ИСК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ И ГЕНОТИПА ВИРУСА

Молекулярно-биологические характеристики вирусного процесса	Медиана иммунорегуляторного индекса Treg/NK (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD107a)
Высокая вирусная нагрузка (n = 42)	32,58*
Низкая вирусная нагрузка (n = 29)	22,28*
Генотип 1 (n = 41)	30,60**
Генотип 3 (n = 29)	29,64**

Примечание: * достоверность различий между группами пациентов с высокой и низкой вирусной нагрузкой; ** инфицированных вирусом гепатита С 1-го и 3-го генотипов, p < 0,05.

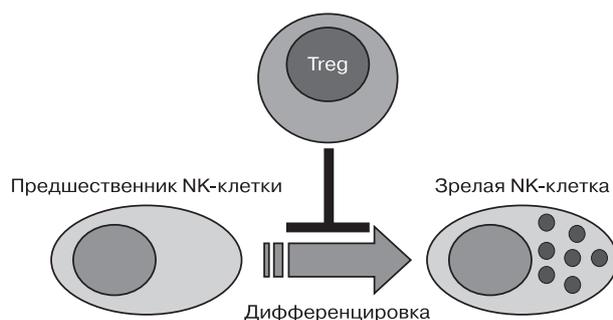


Рисунок 3. Гипотетическое воздействие Treg на созревание NK-клеток [13]

иммунокомпетентных клеток, но и их индивидуальных соотношений у конкретных пациентов. Полученные нами данные подтверждают наличие взаимосвязи между содержанием Т-регуляторных лимфоцитов и активированных NK-клеток. Это косвенно указывает на возможность регулирующего влияния Т-регуляторных лимфоцитов на активацию NK-клеток.

Следует отметить, что такое предположение подтверждается соответствием с данными о вирусной нагрузке и генотипе вируса у больных с хроническим гепатитом С. Наиболее высокие показатели иммуносупрессивного коэффициента (ИСК), представляющего собой соотношение между уровнем Т-регуляторных клеток и активированных NK-клеток, наблюдались у пациентов с высокой вирусной нагрузкой. Следовательно, нарушение элиминации вируса гепатита С может быть связано с супрессией цитотоксической активности NK-клеток, опосредованной Т-регуляторными клетками. Возможно, высокая вирусная нагрузка при хроническом гепатите С может быть связана с более активным прогрессированием заболевания и развитием цирроза печени.

Выявленное нами преобладание Т-регуляторных лимфоцитов над активированными NK-клетками у пациентов с хроническим гепатитом С, инфицированных вирусом с генотипом 1 позволяет предположить, что это может быть одним из механизмов большей резистентности таких больных к противовирусной терапии.

Список литературы

1. Лобзин Ю.В., Никитин И.А., Сухина И.А., Цыган В.Н., Мишин Ю.А. Иммунопатогенез вирусного гепатита С. Иммунологические маркеры прогрессирования заболевания // *ЖМЭИ*. — 2007. — № 6. — С. 75–84.
2. Селютин А.В., Сельков С.А. Методы определения содержания Т-регуляторных клеток в периферической крови // *Terra medica*. — 2008. — № 4. — С. 19–21.

3. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003. — 384 с.
4. Alter H.J. HCV natural history: the retrospective and prospective in perspective // *J. Hepatol.* — 2005. — Vol. 43, N 4. — P. 550–552.
5. Boettler T., Spangenberg H.C., Christoph-Haefelin N., Panther E., Urbani S., Ferrari C., Blum H., von Weizsäcker E.F., Thimme R. T cells with a CD4⁺CD25⁺ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during chronic hepatitis C virus infection // *J. Virol.* — 2005. — Vol. 79, N 12. — P. 7860–7867.
6. Cabrera R., Tu Z., Xu Y., Firpi R.J., Rosen H.R., Liu C., Nelson D.R. An immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection // *Hepatology*. — 2004. — Vol. 40, N 11. — P. 1062–1071.
7. Claus M., Watzl C. Evaluation of human natural killer cell activities in whole blood // *Curr. Protoc. Immunol.* — 2010. — Chapter 7: Unit 7.39.
8. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets // *Trends Immunol.* — 2001. — Vol. 22, N 11. — P. 633–640.
9. Corthay A. How do regulatory T cells work? // *Scand. J. Immunol.* — 2009. — Vol. 70, N 4. — P. 326–336.
10. Dessouki O., Kamiya Y.I., Nagahama H., Tanaka M., Suzu S., Sasaki Y., Okada S. Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2010. — Vol. 393. — P. 331–337.
11. Fazekas de St., Groth B., Zhu E., Asad S., Lee L. Flow cytometric detection of human regulatory T cells // *Methods Mol. Biol.* — 2011. — Vol. 707. — P. 263–279.
12. Fehervari Z., Sakaguchi S. CD4(+) Tregs and immune control // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 114, N 9. — P. 1209–1217.
13. Giroux M., Yurchenko E., St.-Pierre J., Piccirillo C.A. T-regulatory cells control numbers of NK cells and CD8 α immature dendritic cells in the lymph node paracortex // *J. Immunol.* — 2007. — Vol. 179. — P. 4492–4502.
14. Kondo Y., Sung V.M.H., Machida K., Liu M., Lai M.M.C. Hepatitis C virus infects T cells and affects interferon- γ signaling in T cell lines // *Virology*. — 2007. — Vol. 361, N 1. — P. 161–173.
15. Kondo Y., Ueno Y., Kakazu E. Lymphotropic HCV strain can infect human primary naive CD4⁺ cells and affect their proliferation and IFN γ secretion activity // *J. Gastroenterol.* — 2011. — Vol. 46, N 2. — P. 232–241.
16. Li M.O. Transforming growth factor- β regulation of immune responses // *Annu. Rev. Immunol.* — 2006. — Vol. 24. — P. 99–146.
17. Li Y., Zhang T., Ho C., Orange J.S., Douglas S.D., Ho W.-Z. Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression // *J. Leukoc. Biol.* — 2004 — N 76. — P. 1171–1179.
18. Miossec P. Interleukin-17 and type 17 helper T cells // *N. Engl. J. Med.* — 2009. — Vol. 361. — P. 888–898.

19. Mosmann T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties // *Annu. Rev. Immunol.* — 1989. — N 7. — P. 145–173.
20. Orange J.S., Ballas Z.K. Natural killer cells in human health and disease // *Clin. Immunol.* — 2006. — Vol. 118. — P. 1–10.
21. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunological self-tolerance maintained by activated T-cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various auto-immune diseases // *J. Immunol.* — 1995. — Vol. 155. — P. 1151–1164.
22. Sugimoto K., Ikeda F., Stadanlick J., Nunes F.A., Alter H., Chang K.M. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection // *Hepatology.* — Vol. 38. — P. 1437–1448.
23. Szymczak-Workman A.L., Workman C.J., Vignali D.A. Cutting edge: regulatory T cells do not require stimulation through their TCR to suppress // *J. Immunol.* — 2009. — Vol. 182. — P. 5188–5192.
24. Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state // *Int. Immunol.* — 1998. — N 10. — P. 1969–1980.
25. Takehara T., Hayashi N. Natural killer cells in hepatitis C virus infection: from innate immunity to adaptive immunity // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* — 2005. — Vol. 3, N 10. — P. S78–S81.
26. Weaver C.T. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages // *Annu. Rev. Immunol.* — 2007. — N 25. — P. 821–852.
27. Wong M.T., Ye J.J., Alonso M.N., Landrigan A., Cheung R.K. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21 // *Immunol. Cell Biol.* — 2010. — Vol. 88. — P. 624–631.
28. Yamazaki S., Iyoda T., Tarbell K. Direct expansion of functional CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells // *J. Exp. Med.* — 2003. — Vol. 198. — P. 235–247.
29. Yamazaki S., Okada K., Maruyama A., Matsumoto M., Yagita H., Seya T. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6, N 4. — P. e18833.