

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

ИММУНОЛОГИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ И ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

ЦИТОКИНЫ/ХЕМОКИНЫ, КАК ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Семенов А.В.,
Тотоян А.А.

ФБУН НИИЭМ имени Пастера, Санкт-Петербург,
Россия

Введение. Вирусный гепатит С относится к числу социально-значимых инфекционных заболеваний. Характерной особенностью вирусного гепатита С является высокая частота хронизации инфекции, длительная персистенция вируса, риск развития цирроза, рака печени и тяжелых внепеченочных проявлений хронического вирусного гепатита С (ХВГС). Актуальной задачей является диагностика стадий фиброза печени с применением малоинвазивных лабораторных методов с использованием биомаркеров крови, которые дают возможность более точно диагностировать стадию заболевания, наблюдать за темпами прогрессирования фиброза и проводить исследование в динамике лечения ХВГС.

Цель исследования: изучение иммунопатогенетической роли некоторых СС-хемокинов, лигандов CXCR3 и цитокинов, индуцирующих их продукцию, при различных стадиях ХВГС для поиска новых биомаркеров фиброза печени. Задачи исследования: оценить содержание цитокинов TNF α , IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3 α , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC, в плазме крови методом мультиплексного анализа xMAP.

Материалы и методы. Обследовано 73 пациента с диагнозом ХВГС, ранее не получавших противовирусную терапию, с различными стадиями фиброза печени (F0-1 – слабо выраженный фиброз, F2 – умеренный фиброз, F3-4 – тяжелый фиброз, цирроз). Контрольную группу составили практически здоровые лица (n=37). Концентрации цитокинов/хемокинов определяли с помощью мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США) с использованием коммерческих тест-систем «Milliplex MAP» (Millipore, США) по рекомендации фирмы-производителя. Статистическую обработку осуществляли с применением программ GraphPad Prism 6, JMP 11,0.

Основные результаты. У пациентов с ХВГС по сравнению с контрольной группой выявлено повышение TNF α более, чем в 1,5 раза (p<0,0001). При этом у пациентов с тяжелым фиброзом и циррозом печени (F3-4), в 2 раза увеличивалось содержание TNF α (p<0,0001) по сравнению с больными ХВГС с умеренным фиброзом (F2). Концентрация IFN γ в плазме крови больных ХВГС в группе F0-1 не отличается от группы здоровых

доноров. Однако в группе F3-4 концентрация IFN γ в плазме крови в 3 раза (p<0,05) превышала значения в группах здоровых доноров и больных ХВГС с фиброзом печени F0-1 и F2. Таким образом, возрастание в периферической крови больных ХВГС содержания IFN γ и TNF α можно рассматривать как признак прогрессирования фиброза печени. Уровни хемокинов CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL8/MCP-2 у больных ХВГС, которые приводят к миграции в печень в основном неспецифических клеток иммунной системы, статистически значимо возрастали (p<0,05), как и CCL20/MIP-3 α (p=0,02). У пациентов с ХВГС значительно увеличивалась концентрация всех лигандов CXCR3, привлекающих в очаг воспаления активированные Т- и В-лимфоциты: CXCL9/MIG (p=0,001), CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAC (p<0,0001). Выявлена прямая зависимость между уровнями CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAC (r=0,68, p<0,0001; r=0,52; p<0,0001, соответственно) в плазме крови и степенью фиброза печени. Функции CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAC сводятся к привлечению и удержанию клеток, которые экспрессируют рецептор CXCR3 - в основном активированные Т-лимфоциты, Т- и В-клетки памяти, обладающие эффекторными функциями. Для нахождения оптимальной комбинации биомаркеров с целью дифференциальной диагностики стадий фиброза печени был применен метод построения деревьев решений. В результате установлено, что совместное определение трех маркеров CXCL11/ITAC, TNF α и CCL20/MIP-3 α является достаточным для оценки степени фиброза печени у больных ХВГС (AUC > 0,8). Были получены следующие пороговые значения для дифференциальной диагностики F0-1 и F2: CXCL11/ITAC – 166,5 пг/мл, TNF α – 15,7 пг/мл, CCL20/MIP-3 α – 10,6 пг/мл; для дифференциальной диагностики F2 и F3-4: TNF α – 15,8 пг/мл, CXCL11/ITAC – 301,8 пг/мл, CCL20/MIP-3 α – 15,5 пг/мл. Использование данного алгоритма для диагностики стадий фиброза печени позволяет достигнуть чувствительности метода 67-91% при достаточной специфичности.

Заключение. Данное исследование подтверждает значимость цитокинов/хемокинов в иммунопатогенезе ХВГС, в том числе в процессах фиброгенеза. Концентрации хемокинов CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAC и цитокинов IFN γ и TNF α в плазме крови могут служить дополнительными иммунологическими критериями прогрессирования ХВГС. Предложенный алгоритм с определением цитокинов CXCL11/ITAC, TNF α , CCL20/MIP-3 α в плазме крови возможно использовать для дифференциальной диагностики стадий фиброза печени при ХВГС.

ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ ДГЭА-С И Г-КСФ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Бегишева Р.Р.

Институт Иммунологии Академии Наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

ВИЧ инфекция представляет собой огромную проблему и исследования в этой области являются очень актуальными. Наша работа посвящена исследованию эндокринно-иммунных взаимосвязей при данной инфекции. Функционирование организма зависит от слаженных процессов взаимодействия всех его структур. Основное значение в эти процессы вносят центральная нервная система, эндокринная и иммунная системы, связь между которыми осуществляют гормоны и цитокины. По литературным данным, научные исследования взаимосвязей иммунной и эндокринной систем при ВИЧ/СПИД заболеваниях — единичны, и работы в данной области представляют собой большой интерес.

Целью исследования явилась оценка содержания уровня ДГЭА-С (дегидроэпиандростерон-сульфат) и Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) в зависимости от абсолютного содержания CD4+ лимфоцитов, взаимосвязи между ними.

Материалы и методы: Под нашим наблюдением находились 18 ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на учете в РЦ СПИД. 5 пациентов были во 2-й клинической стадии, 5 — в 3-й клинической стадии, 8 — в стадии СПИД. У пациентов определяли уровень ДГЭА-С — радиоиммунным методом (набор фирмы “Beckman Coulter”, радиоиммунный счетчик “Гамма-12”) и уровень Г-КСФ методом ИФА (иммуноферментная тест-система «Вектор-Бест»). Диагноз ВИЧ/СПИД ставился на основании ИФА и метода иммунного блоттинга, а стадии заболевания по абсолютному содержанию CD4+ лимфоцитов и клиническим проявлениям. Содержание CD4+ лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии.

Основные результаты: Уровень ДГЭА-С выявлялся с широким размахом индивидуальных значений. Во 2-й стадии заболевания средний уровень ДГЭА-С составил $206,9 \pm 62,3$ мкг/100 мл (контроль — $193 \pm 15,2$ мкг/100 мл). В 3-й стадии заболевания средний показатель ДГЭА-С составил $245,2 \pm 56,4$ мкг/100 мл. В 4-й стадии содержание ДГЭА-С в среднем составило $152,8 \pm 43,9$ мкг/100 мл, что было несколько ниже контрольных данных ($p > 0,05$).

На всех стадиях ВИЧ-инфекции уровень Г-КСФ выявлялся выше контрольных данных ($p < 0,001$). Содержание Г-КСФ во 2-й стадии заболевания составило в среднем $168,4 \pm 70,2$ пг/мл, что достоверно превышало данные контроля ($6,04 \pm 2,2$ пг/мл, $p < 0,001$). В 3-й стадии заболевания уровень Г-КСФ в среднем составил $203,5 \pm 52,2$ пг/мл. В 4-й стадии ВИЧ/СПИД заболевания уровень Г-КСФ составил в среднем $196,8 \pm 32,2$ пг/мл.

Корреляционный анализ, проведенный между этими двумя показателями, обнаружил достоверную взаимосвязь между ними. Так во 2-й стадии заболевания коэффициент корреляции (r) составил $+0,78$, в 3-й стадии — $+0,63$ и в 4 стадии — $+0,68$.

Заключение: Таким образом, мы определили повышение среднего показателя уровня ДГЭА-С во 2-й и 3-й клинических стадиях ВИЧ-инфекции, а в стадии СПИД понижение уровня данного гормона. Здесь нужно отметить, что ДГЭА-С является «антиглюкокортикоидным» или проще говоря «антистрессорным» гормоном. В ста-

дии СПИД идет угнетение всех звеньев иммунитета, что возможно приводит к угнетению выработки данного гормона в надпочечниках.

Средний уровень Г-КСФ превышал уровень контрольных данных на всех стадиях заболевания. Это связано с тем, что у больных с ВИЧ инфекцией присутствует большое количество оппортунистических инфекций. Вместе с этим, в стадии СПИД уровень Г-КСФ был снижен относительно 3-й стадии ВИЧ инфекции, где наблюдалось наибольшее повышение уровня данного цитокина, что свидетельствует об угнетении иммунной защиты в терминальной стадии заболевания.

В результате корреляционного анализа наши данные показали тесную взаимосвязь между Г-КСФ и ДГЭА-С на разных стадиях заболевания, что указывает на наличие регулирующих влияний ДГЭА-С на Г-КСФ и подтверждает, что функционирование иммунной системы находится под гормональным контролем, а так же, сами нарушения в органах иммунитета приводят к изменениям в гормональной системе.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о тесной взаимосвязи эндокринной и иммунной систем на всех этапах развития ВИЧ инфекции.

ДЕТЕРМИН КОМБО – ЭКСПРЕСС-ТЕСТ НОВОГО 4-ГО ПОКОЛЕНИЯ

Дробченко С.Н.¹, Марголин О.²

¹ ЗАО «Биоград», Санкт-Петербург, Россия

² Alere Medical Co Ltd, Япония

Тесты 3-его поколения, к которому относятся большинство выпускаемых экспресс-тестов, не позволяют определять раннюю стадию инфицирования ВИЧ, так называемый период серонегативного окна. Именно на эту стадию приходится пик концентрации вируса в крови, когда организм еще не выработал антитела к вирусу. Поэтому вероятность передачи ВИЧ-инфекции на этой стадии выше, чем на последующих этапах, до развития выраженной иммуносупрессии. Именно поэтому компанией Alere были разработаны инновационные тесты на ВИЧ 4-го поколения — экспресс-тест Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo (Alere, Япония).

ИХА экспресс-тест на ВИЧ 4-го поколения Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo выявляет ВИЧ-инфекцию в ранней стадии, еще до появления антител. Данный экспресс-тест определяет наличие, как антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, так и антигена р24 ВИЧ. Высокая точность теста подтверждена испытаниями на тысячах образцов. В данной работе описаны результаты исследования образцов сероконверсионных панелей первыми в мире экспресс-тестами 4-го поколения Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo.

Методы: исследования были проведены на сероконверсионной панели: панель Zeptometrix (BCR) 6246, США и 33 панели ВВИ, США. Тесты Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo выпускаются в формате тест-карт — по 10 тест-полосок, герметично индивидуально упакованных в фольгу. На каждую тест-полоску нанесены рекомбинантные антигены ВИЧ-1/ВИЧ-2, синтетические пептиды, антитела анти-р24 и авидин. Для проведения анализа отделяли одну тест-полоску от тест-карты, удаляли защитную фольгу с тест-полоски и наносили 50 мкл образца. Результат проявлялся в виде окрашенных полос в зоне результата через 20 минут. Если антиген р24 ВИЧ присутствовал в образце, красная линия появлялась в области окна антигена (Ag). При наличии

в образце антител к ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы О и/или ВИЧ-2 проявлялась красная полоса в области окна антител (Ab). Во всех образцах появлялась контрольная полоса.

Результаты: на панели ВСП тест Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo сначала определял наличие антигена p24, при этом полоса антигена выявлялась слабой, затем интенсивность полосы антигена росла (15,16 образцов) и, начиная с 16 образца, появлялась слабая полоса антител. Далее интенсивность полосы антител возрастала, а полоса антигена исчезала полностью. Тесты 3-го поколения на данной панели определяли ВИЧ, начиная с 16 образца, когда появлялась слабая полоса антител. Тесты 3-го поколения не определяли ВИЧ-положительные образцы 14 и 15, на которые приходится наибольшая концентрация вируса в крови. На образцах данной панели применение теста 4-го поколения позволило выявить ВИЧ на 7 дней раньше. На 10 панелях ВВИ тест Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo определял ВИЧ инфекцию, начиная с одного и того же образца, что и тест 3-го поколения и на 23 панелях опережал тест 3-го поколения на 2-20 дней. Во всех панелях, кроме одной, от одного до пяти образцов дали положительную реакцию на антиген p24, т.е. в этих образцах выявлена острая инфекция (наличие антигена в этих образцах заранее определено в соответствии с характеристикой панели).

Выводы: тесты 4-го поколения Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo, способны выявлять ВИЧ-инфекцию на ранней стадии, еще до появления определенных титров антител. Это особенно важно, поскольку наибольший риск передачи ВИЧ приходится именно на раннюю стадию. Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo дифференцирует выявление антигена ВИЧ p24 и антител к ВИЧ в одном анализе, что позволяет определить статус каждого из маркеров. Экспресс-тесты Детермин обладая высокой чувствительностью, специфичностью, характеризуются простотой постановки анализа, легкостью интерпретации и стабильностью результата. Высокое значение PPV тестов Детермин позволяет быть уверенным в полученном положительном результате и избежать неоправданного назначения терапии для профилактики вертикальной передачи ВИЧ. Тесты Детермин зарегистрированы Росздравнадзором, имеют CE-марку, разрешены FDA для использования в США. По результатам испытаний и инспекций производства включены в список преквалифицированных диагностических продуктов ВОЗ. Поставляется в рамках программ ВОЗ, ЮНИСЕФ, Глобального Фонда. 56% от объёма закупок Глобального фонда и 87% закупок ВОЗ составляют экспресс-тесты Determine™ HIV-1/2 (выявляют антитела к ВИЧ) и Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo (выявляют антитела и антиген p24).

АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

Елезов Д.С.¹, Арсентьева Н.А.¹, Кудрявцев И.В.², Семенов А.В.¹, Тотолян А.А.¹

¹ ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² ФГУН «НИИ экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Одной из причин персистенции вируса гепатита С является нарушение баланса между регуля-

торным и эффекторным звеньями иммунной системы в сторону преобладания иммуносупрессии в результате нарушения функций Т-регуляторных клеток. При хроническом вирусном гепатите С (ХВГС) не было обнаружено значительных изменений в содержании Т-регуляторных клеток периферической крови, но субпопуляционный состав данной популяции был мало исследован. В частности, при данном заболевании не был проведен анализ популяций, экспрессирующих CD62L и HLA-DR.

Цель работы. Оценка количественного изменения субпопуляций Т-регуляторных клеток периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С.

Материалы и методы. В рамках проведенного исследования было обследовано 29 человека с подтвержденным диагнозом «хронический вирусный гепатит С» и 27 практически здоровых лиц. Измерение количества клеток в популяциях проводили методом проточной цитофлюориметрии с использованием прибора Navios (Beckman Coulter, США). Для окрашивания лимфоцитов использовали следующие меченные флюорохромами моноклональные антитела: HLA-DR-FITC, CD25-PE, CD62L-ECD, CD3-PC7, CD127-APC, CD4-AF700, CD45-AF750. Переменные сравнивали, используя непараметрический тест Манна-Уитни.

Результаты. Содержание Т-регуляторных клеток (CD25^{bright}CD127-CD3⁺CD4⁺CD45⁺), экспрессирующих HLA-DR и CD62L, было оценено среди Т-хелперных клеток, а также определены их абсолютные значения. У группы больных ХВГС по сравнению с группой контроля было определено повышенное содержание субпопуляции CD62L⁻ Т-регуляторных клеток ($p < 0,0001$) и сниженный процент субпопуляции CD62L⁺ Т-регуляторных клеток относительно Т-хелперов ($p = 0,0004$). Количество CD62L⁻ Т-регуляторных клеток составило 19,02 (14,69; 24,05) 10^6 /л у больных ХВГС и 9,91 (7,28; 13,88) 10^6 /л у группы контроля, процент CD62L⁻ Т-регуляторных клеток относительно Т-хелперов составил 2,34 (1,69; 2,985) и 1,37 (1,09; 1,7), соответственно. Процент CD62L⁺ Т-регуляторных клеток относительно Т-хелперов составил 4,93 (3,875; 7,06) у больных ХВГС и 7,28 (5,95; 8,55) у группы контроля. Достоверных различий в содержании DR⁺ Т-регуляторных клеток между группами выявлено не было.

Заключение. Были определены изменения в субпопуляционном составе Т-регуляторных клеток периферической крови при ХВГС. Повышенное содержание субпопуляции CD62L⁻ Т-регуляторных клеток и сниженное CD62L⁺ Т-регуляторных клеток при ХВГС может говорить о превалирующем участии субпопуляции CD62L⁻ Т-регуляторных клеток в иммунопатогенезе ХВГС.

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОГО ЛЕЧЕНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

Касимова Н.Б.¹, Галимзянов Х.М.¹, Шерышева Ю.В.¹, Аршба Т.Е.², Кугушева С.С.²

¹ ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия

² ГБУЗ АО «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничого», Астрахань, Россия

Вирусные гепатиты С остаются серьезной проблемой в связи с их особенностями течения и, несмотря на по-

явление новых методов патогенетической и противовирусной терапии, лечение остается сложной и до конца нерешенной задачей.

Целью работы стало определение содержания отдельных цитокинов в сыворотке крови больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) в зависимости от степени ферментативной активности и противовирусного лечения.

После обследования в стационаре 30 больных ХВГС в фазе репликации наблюдались и лечились амбулаторно, получая противовирусные препараты (ПВП). Среди пациентов было 18 мужчин и 12 женщин в возрасте от 19 до 61 года. Диагноз ХВГС подтвержден в ИФА и в ПЦР. Установлены генотипы вируса С: у 7 чел. — генотип 1в, у 1 чел. — 1а, у 15 чел. — 3а, у 5 чел. — 3а/3с, у 2 чел. — 2а. У 17 пациентов ХВГС протекал без ферментативной активности (АЛаТ — 0,35 — 0,71 ммоль/л), а у 13 — с низкой ферментативной активностью (АЛаТ увеличена в 1,5–2 раза). Вирусная нагрузка у 1 чел. была очень высокой (122533934 МЕ/мл), у 19 чел. — высокая (от 400 тыс. до 13 млн. МЕ/мл), у 6 чел. — средняя (от 100 тыс. до 400 тыс.), у 4 чел. — низкая (меньше 100 тыс. МЕ/мл). Комплексное лечение с применением 3 ПВП (альфарон, ингарон, рибамидил) больные ХВГС с 1^м генотипом получали 12 мес., а с не 1^м генотипом — 6 мес.

Определение уровня цитокинов (α -ИФН, γ -ИФН, $\alpha\alpha$ -ФНО, ИЛ-4, ИЛ-10) проводили в сыворотке крови больных ХВГС в ИФА, используя тест-системы ООО «Цитокин» СПб. Для сравнительного анализа исследовалась кровь 30 доноров.

Оказалось, что у больных ХВГС как при низкой степени ферментативной активности, так и без таковой увеличивалось содержание α -ИФН до лечения и во все сроки лечения (3 — 6 — 9 — 12 мес.) в 13,1 — 12,4 и 10,6 — 11,6 раз ($p < 0,05$) соответственно, при этом через 6–12 мес. терапии отмечалось постепенное снижение уровней α -ИФН, но не достигало контроля. Уровень γ -ИФН у больных с низкой ферментативной активностью до лечения и во все сроки лечения (3 — 6 — 9 — 12 мес.) был сниженным в сравнении с контролем в 2,9–3,7 раз ($p < 0,05$). У больных ХВГС без ферментативной активности до лечения содержание γ -ИФН было в 1,9 раза ниже контроля ($p < 0,05$), а через 3 мес. приема ПВП увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с уровнем до лечения и через 6 мес. лечения уравнивалось с контролем ($p < 0,05$). У пациентов ХВГС с низкой ферментативной активностью уровни α -ФНО, ИЛ-4 и ИЛ-10 до лечения и во все сроки приема ПВП (3 — 6 — 9 — 12 мес.) были ниже контроля ($p < 0,05$), а у больных без ферментативной активности уровень α -ФНО до и после лечения оставался ниже контроля в 2,9–4,7 раза ($p < 0,05$), при этом содержание ИЛ-4 и ИЛ-10 у половины обследованных пациентов до и после лечения ПВП было выше контроля в 4,0–5,8 и 3,1–1,7 раза ($p < 0,05$), а у остальных больных — ниже в 4,8–4,1 и 3,1–2,4 раза ($p < 0,05$).

Итак, содержание цитокинов зависит от степени ферментативной активности ХВГС. Противовирусная терапия 3 препаратами (альфарон, ингарон, рибамидил) не устраняет дисбаланс цитокинов, но приводит к некоторому улучшению — снижению содержания α -ИФН, ИЛ-4 и увеличению γ -ИФН до контроля, что опосредовано, оказывает влияние на иммунные процессы в организме больных в поддержании баланса Th-1 / Th-2 лимфоцитов.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости тщательного индивидуального подбора противовирусных препаратов с учетом генотипа вируса, величины вирусной нагрузки и ферментативной активности ХВГС.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ В 118 ПОЗИЦИИ HBSAG КАК ВЕРОЯТНЫЙ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАРКЕР СУБГЕНОТИПА D2 И СУБТИПА AUW3 ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Коноплева М.В., Ярош Л.В., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Соколова М.В., Баженов А.И.¹, Годков М.А., Семенов Т.А., Суслов А.П.

ФГБУ «ФНИЦЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

¹ГУЗМ НИИ скорой помощи Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

HBSAg является основным диагностическим маркером инфекции вируса гепатита В (ВГВ), несет основные В-клеточные эпитопы, опосредующие протективный иммунитет, а также является главной антигенной компонентой вакцин против гепатита В. Модификации в S-гене вируса гепатита В могут приводить к изменениям серологических свойств HBSAg, что увеличивает вероятность ускользания от вакцинального и диагностического контроля. Необходим постоянный мониторинг за возникновением и распространением мутантных вариантов вируса, а также определение мутаций, наиболее характерных для того или иного генотипа вируса для понимания процесса эволюции вируса, определения маркеров того или иного субтипа и/или генотипа и мониторинга за эпидемиологическими показателями.

Секвенирование S-гена в 132 изолятах ВГВ, полученных из Московского региона, показало, что 21 изолят (15,9%) относился к генотипу А, а 110 — к генотипу D (83,3%). В образцах ВГВ с генотипом D замены выявлены в 69,1% (76 из 110), а с субгенотипом D2 — в 98,0% (48/49), причем все вариабельные изоляты имели субтип ауw3. Чаще всего изменения в 118 позиции сопровождались изменениями в позиции 128. Частота встречаемости серологически значимых изолятов с эскейп-мутациями S-гена в 145 и 143 положениях была 1,52% и 2,27%, соответственно, доля мутантов по 144 а.к.о. HBSAg — 2,27%, а по 133 а.к.о. — 3,10%. Доля всех серологически значимых мутантных изолятов ВГВ составила 9,1%.

В целом, исследования выявили важную закономерность: вариабельность в 118 позиции практически полностью совпадает с наиболее вариабельным субгенотипом D2 и субтипом ауw3. Таким образом, модификация в 118 позиции может служить дополнительным маркером возможного генетического дрейфа ВГВ. В то же время, обнаруженное относительно большое количество серологически значимых мутаций свидетельствует о том, что необходимо ужесточить диагностический контроль и учитывать это при применении вакцин.

ИНТЕРФЕРОН- γ ПРИ ПСОРИАЗЕ С УЧЕТОМ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Короваева И.А., Складар Л.Ф., Симакова А.И., Копотилова О.Ю.

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, Россия

Псориаз у ВИЧ-инфицированных встречается, по разным данным, с частотой от 1 до 6%, что приблизительно в 3 раза превышает частоту встречаемости в общей популяции. Известно, что лечение, направленное на уменьшение количества Т-клеток или их актив-

ности, в целом способствует лечению псориаза, а ВИЧ-инфекция сопровождается уменьшением количества Т-клеток. Однако с течением времени при прогрессировании ВИЧ-инфекции, увеличением вирусной нагрузки и уменьшением количества циркулирующих CD4+-клеток, псориаз у ВИЧ-инфицированных обостряется или утяжеляется, что делает проблему исследования клинико-иммунологических особенностей течения псориаза у таких пациентов, несомненно, актуальной. Наиболее важными провоспалительными цитокинами, активирующими клеточное звено иммунитета, являются интерлейкин-2 (ИЛ-2), интерферон- γ (ИНФ- γ), фактор некроза опухолей (ФНО).

Целью нашей работы явилось изучение уровня ИНФ- γ у ВИЧ-положительных и ВИЧ-негативных пациентов с распространенным псориазом в стадии обострения.

Материалы и методы. Обследовано 100 пациентов с распространенным вульгарным псориазом у мужчин в возрасте от 25 до 50 лет. 50 из них — ВИЧ-положительных и 50 — ВИЧ-негативных. Индекс тяжести и распространенности псориаза PASI (Psoriasis Area and Severity Index) у исследованных больных варьировал от 20 до 50 баллов (среднее значение индекса составило $30 \pm 0,47$ баллов), что соответствует умеренной и тяжелой степеням тяжести течения заболевания. Контрольную группу составили 30 здоровых лиц в возрасте от 25 до 50 лет, не имевших на момент обследования клинических признаков иммунопатологии. Определение уровня ИНФ- γ в сыворотке крови проводили с помощью специфических реактивов фирмы «R&D Diagnostics Inc» (США) методом сэндвич-варианта твердофазного ИФА в соответствии с инструкцией по применению. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «Microsoft Excel». Применяли методы описательной статистики с вычислением средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m), определением минимального и максимального значения показателя (min_max).

Результаты проведенного исследования показали, что уровень ИНФ- γ был повышен как у ВИЧ-положительных пациентов (почти в 4 раза выше показателей, чем у здоровых), так и у ВИЧ-негативных, но в меньшей степени, и составил при этом $43,7 \pm 0,65$ пг/мл и $31,2 \pm 0,58$ пг/мл соответственно, против $12,6 \pm 0,8$ пг/мл в контроле, ($p < 0,001$).

Таким образом, у больных псориазом в роли антигенного стимула, вызывающего воспаление, ангиогенез и пролиферацию иммунокомпетентных клеток, выступает ДНК распадающихся кератиноцитов. ДНК кератиноцитов стимулирует антигенные рецепторы на плазматочных дендритных клетках, которые в результате такой стимуляции начинают секретировать воспалительные цитокины, в том числе и ИНФ- γ , стимулирующие дальнейший каскад иммунных реакций. Увеличение количества системного ИНФ- γ коррелировало с прогрессированием ВИЧ-ассоциированного иммунодефицита.

НЕКОТОРЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Лукашова Л.В., Лепехин А.В., Портягина Е.В., Чернышова Н.П., Хмелева А.Н., Добкина М.Н.

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Томская область в 2014 г. заняла 2 место по уровню заболеваемости ВИЧ-инфекцией среди территорий, входя-

щих в состав Сибирского федерального округа, с интенсивным показателем 162,0 на 100 тыс. населения.

В данном сообщении представлены результаты наблюдения 30 пациентов, поступивших в инфекционную клинику ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России в период 2013-2014 гг. с различными синдромами острой инфекционной патологии неуточненного генеза. Диагнозы при поступлении (с учетом клинического синдрома комплекса) — иерсиниозы (73,4%) и ВЭБ-инфекция (26,6%). ВИЧ-положительный статус у всех больных впервые определен в процессе обследования и дифференциально-диагностического поиска в клинике. Диагноз ВИЧ-инфекции верифицирован данными ИФА крови с определением р24 HIV и антител к HIV с последующим подтверждением их специфичности в реакции иммуноглобулина. В комплекс обследования пациентов включали определение уровня CD4+-лимфоцитов методом проточной цитометрии и концентрации РНК HIV в плазме крови в ПЦР с гибридизационно-флюоресцентным методом детекции. У 53,3% лиц имели место заболевания, сочетанные с ВИЧ-инфекцией (HCV- и HBV-инфекции). В возрастной структуре преобладали возрастные группы 20-29 лет (40%) и 30-39 лет (33,3%), в гендерной — мужчины (60%). В структуре путей передачи отмечена одинаковая частота регистрации (по 40%) парентерального, связанного с внутривенным употреблением наркотиков, и полового путей, у 20% больных констатирован неустановленный путь передачи.

У большинства пациентов определена стадия первичных проявлений 2Б (60%), у 26,7% — стадия первичных проявлений 2В и у 13,3% — субклиническая стадия 3. В стадии 2Б у 44,4% больных наблюдали моноуклеозоподобный синдром (сочетание лимфаденопатии, полиаденопатии, явлений фарингита/тонзиллита, гепатоспленомегалии и экзантемы), у остальных имели место 1-2 клинических симптома, типичных для данного варианта стадии первичных проявлений. Содержание CD4+-лимфоцитов в этой группе варьировало в пределах 0,2-1,3 Г/л (у 55,5% — $> 0,5$ Г/л, у 44,5% — 0,5-0,2 Г/л), а уровень РНК HIV — от < 400 до 701680 копий/мл плазмы крови, с выраженной вирусной нагрузкой (более 500000 копий/мл плазмы крови) у 1/3 обследованных. В стадии 2В из вторичных заболеваний верифицировали кандидоз — 75% (орофарингеальный, эзофагит, цистит), активацию туберкулеза легких — 50% и реактивацию герпесвирусных инфекций — 25% (ЦМВИ и ВЭБ-инфекция) на фоне выраженной лихорадочной реакции в течение 3-4 недель; у 1/2 лиц имела место сочетанная вторичная патология. При обследовании регистрировали отсутствие признаков иммунодефицита по уровню CD4+-лимфоцитов и низкую вирусную нагрузку (400-1417 копий/мл плазмы крови) у всех представителей этой группы. В стадии 3 у пациентов выявляли признаки лимфаденопатии, с умеренным иммунодефицитом (уровень CD4+-лимфоцитов — 0,5-0,3 Г/л) при различной концентрации РНК HIV в плазме крови (у 75% — низкая, у 25% — высокая).

Следует отметить в качестве интересного аспекта данного исследования факт манифестации вторичных заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией в стадии 2В при отсутствии признаков иммуносупрессии и минимальном уровне вирусной репликации. Эта ситуация согласуется с опубликованными результатами исследований последних лет, свидетельствующими о том, что активация иммунной системы при острой ВИЧ-

инфекции является компенсаторным ответом макроорганизма на инфекционную агрессию, благодаря которому до определенного момента обеспечивается поддержание достаточного количества CD4⁺-лимфоцитов и снижение вирусной нагрузки; однако в последующем результатом такой персистирующей активации является истощение иммунной системы с неизбежным прогрессированием заболевания.

ВЛИЯНИЕ ВААРТ НА ДИНАМИКУ CD4⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ В ХОДЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С У ВГС/ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ

Сташишкис Т.А.¹, Дунаева Н.В.², Ковеленов А.Ю.¹, Исаева Г.Н.¹

¹ ГКУЗ ЛО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. По данным ВОЗ в мире насчитывается более 35 млн инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). В странах Европы около 30% ВИЧ-инфицированных заражены вирусом гепатита С (ВГС), в группах риска – 70-80%. Патология печени у пациентов с сочетанной ВГС/ВИЧ-инфекцией прогрессирует ускоренными темпами и является второй по частоте причиной смерти, уступая лишь СПИД-ассоциированным болезням. В связи с чем, рекомендуется проводить противовирусную терапию (ПВТ) хронического гепатита С (ХГС) всем ВИЧ-инфицированным пациентам с ХГС.

Цель. Оценить влияние ВААРТ на динамику CD4⁺Т-лимфоцитов в процессе противовирусной терапии ХГС у ВГС/ВИЧ-инфицированных, проводимой в максимально полных дозах в течение всего курса.

Материалы и методы. В данное открытое нерандомизированное проспективное исследование включено 242 пациента с сочетанной ВГС/ВИЧ-инфекцией, прошедшие курс ПВТ ХГС в Центре в 2008-2014 гг. Пациенты были обследованы перед стартом, в ходе лечения и через 24 недели после завершения/досрочного прекращения терапии. Не завершили по разным причинам 48-недельный курс ПВТ 37 человек (15,2 %). Вышеуказанные пациенты исключались из анализа нежелательных явлений терапии (4, 12, 24, 48 недели) по мере выбытия. Выделены подгруппы: 1-я – не получающие ВААРТ (n=115 чел), 2-я – находящиеся на ВААРТ (n=127 чел).

Применяли пегилированный интерферон альфа 2a (221 человек) или 2b (21 человек) и рибавирин.

Пациентов вели согласно рекомендациям European Association for the Study of the Liver – EASL для ВИЧ-инфицированных [2012]. Но несколько пациентов, были взяты на ПВТ ХГС с уровнем CD4 Т-лимфоцитов менее 200 кл/мкл (150, 171, 172, 183 и 197 кл/мкл), один из них не получал ВААРТ.

Результаты. Уровень CD4⁺Т-лимфоцитов, согласно критерию Уилкоксона для связанных выборок, статистически значимо снижался до 24-ой недели терапии в обеих подгруппах. Затем начался незначимый прирост клеток.

Первая подгруппа (медиана (25/75%о):

старт 478 (365/640)кл/мкл→W12 345 (271/470), p<0,001

W12→W24 327 (230/444), p<0,001

W24→W48 337 (259/481), p=0,139

W48→6 мес после окончания ПВТ 456 (331/574) кл/мкл, p<0,001.

Вторая подгруппа (медиана (25/75%о):

старт 394 (303/520)кл/мкл→W12 293 (209/429), p<0,001

W12→W24 259 (210/379), p<0,001

W24→W48 305 (232/366), p=0,896

W48→6 мес после окончания ПВТ 440 (330/584) кл/мкл, p<0,001.

Подгруппы статистически значимо различались между собой в каждой из контрольных точек, начиная со старта и до 48 недели терапии, несмотря на достоверное снижение количества CD4⁺Т-лимфоцитов, клинических признаков прогрессирования ВИЧ-инфекции не было. Через 6 месяцев после окончания терапии уровень CD4⁺Т-лимфоцитов полностью восстановился в обеих подгруппах и статистическая разница между подгруппами, наблюдаемая на старте терапии, нивелировалась.

Заключение. Согласно полученных нами данных, использование дозировок пегилированного интерферона и рибавирина, рассчитанных на массу тела, в течение всего курса терапии ХГС у ВГС/ВИЧ-инфицированных пациентов как получающих, так и не получающих ВААРТ безопасно и не приводит к прогрессированию ВИЧ. В течение всего курса терапии уровень CD4⁺Т-лимфоцитов у пациентов на ВААРТ сохраняется значимо более низким, чем у пациентов без ВААРТ.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ГИБЕЛИ CD4⁺ЛИМФОЦИТОВ У КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ GP120 ГЛИКОПРОТЕИНОМ ВИЧ-1

Храмова Т.В., Бедулева Л.В., Берёзкина С.Ю., Меньшиков И.В., Толстолицкая Т.О., Вахрушева К.М.

ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница МЗ УР», Ижевск, Россия

В настоящее время установлено, что основную массу гибнущих CD4⁺лимфоцитов при ВИЧ-инфекции составляют незараженные ВИЧ клетки, однако механизм их гибели остается не ясен. Наиболее обоснованной является гипотеза активационно-индуцированной смерти CD4⁺лимфоцитов. Согласно данной гипотезе ВИЧ инфекция вызывает хроническую поликлональную активацию CD4⁺лимфоцитов, активированные лимфоциты затем уничтожаются по механизму апоптоза. На роль потенциальных факторов хронической активации CD4⁺клеток претендуют воспалительные цитокины и аутоантитела к CD4 молекуле Т-хелперов. **Целью данной работы** явилось исследование роли аутоиммунной реакции к CD4 в развитии ВИЧ-индуцированной CD4⁺лимфоцитопении.

Крыс Wistar (n=8) иммунизировали gp120 гликопротеином ВИЧ (ACROBiosystems) внутривенно в дозе 25 мкг на животное однократно в составе неполного адьюванта Фрейнда (НАФ). Контрольные крысы (n=10) получили инъекцию НАФ. У животных еженедельно забирали кровь методом кардиальной пункции под анестезией. В плазме крови определяли антитела к gp120 ВИЧ и аутоантитела к рекомбинантному CD4 крыс (R&DSystems) методом иммуноферментного анализа. Титр ревматоидного фактора определяли методом непрямой агглютинации танизированных нагруженных гомологичным IgG

эритроцитов. Количество CD4+лимфоцитов в периферической крови крыс измеряли методом проточной цитофлуориметрии.

Иммунизация крыс Wistar gp120 гликопротеином ВИЧ вызвала продукцию не только антител к gp120 ВИЧ, но и аутоантител к CD4. Уровень антител к gp120 ВИЧ оставался высоким в течение 5 месяцев наблюдения, более того, периодически спонтанно увеличивался. Продукция аутоантител к CD4 также носила хронический характер. У контрольных крыс, получивших НАФ, продукции аутоантител к CD4 выявлено не было. В соответствии с аутоиммунной гипотезой СПИДа аутоантитела к CD4 крысы должны вызывать гибель CD4+лимфоцитов крысы. У крыс, развивших аутоиммунную реакцию к CD4, среднее за период наблюдения значение количества CD4+лимфоцитов (1301 ± 794 клеток в мкл) достоверно ниже ($p=0,02$) среднего уровня CD4+лимфоцитов (1748 ± 755 клеток в мкл) в периферической крови контрольных крыс. Самое низкое количество CD4+клеток, выявленное у крыс, иммунизированных gp120 и развивших аутоиммунную реакцию к CD4, составило 293 клетки в мкл крови, тогда как у контрольных крыс – 656 клеток в мкл. Снижение CD4+лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином, носит транзиторный характер. Вопреки ожиданиям непосредственной связи между уровнем аутоантител к CD4 и количеством CD4+лимфоцитов в крови не выявлено. В то же время мы заметили, что снижение количества CD4+лимфоцитов в крови крыс совпадает со спонтанным повышением уровня ревматоидного фактора в крови. Ревматоидный фактор был исследован у крыс, иммунизированных gp120, с целью выяснения его роли в регуляции иммунного ответа к gp120, так как ранее на нескольких экспериментальных моделях было показано его участие в предотвращении развития аутоиммунных заболеваний. Сравнительный анализ количества CD4+лимфоцитов у крыс с относительно высоким уровнем РФ (титр $>1:16$) и крыс с относительно низким уровнем РФ (титр $\leq 1:16$), выявил достоверно низкий уровень CD4+клеток у крыс с высоким уровнем РФ. Данная связь характерна только для крыс имеющих антитела к CD4, у крыс, не имеющих аутоантител к CD4, количество CD4+клеток не зависит от содержания РФ в крови. На основании полученных данных можно предполагать, что гибель CD4+лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 – результат совместного действия аутоантител к CD4 и ревматоидного фактора.

Таким образом, иммунизация крыс Wistar gp120 гликопротеином ВИЧ вызывает развитие гуморальной аутоиммунной реакции к CD4 и транзиторное снижение CD4+лимфоцитов. Прямой связи между уровнем аутоантител к CD4 и количеством CD4+лимфоцитов в крови не выявлено. CD4+лимфоцитопения возникает на фоне высокого уровня РФ у крыс, имеющих антитела к CD4, что дает основание предполагать, что гибель CD4+лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120, является результатом совместного действия аутоантител к CD4 и ревматоидного фактора.

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ CD69 – АНТИГЕНА CD8+ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Шакина Н.А.¹, Куртасова Л.М.^{1,2}, Шмидт А.Р.¹

¹ Краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД, Красноярск, Россия

² Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

Введение. Цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) играют важную роль в противовирусном Т-клеточном иммунном ответе. Они несут на поверхности мембраны гликопротеин CD8 и распознают пептидные антигены, в том числе вирусные, представляемые молекулами ГКГ I класса. Практически сразу после инфицирования ВИЧ инициируется мощный клеточный ответ, противовирусную активность которого преимущественно определяют CTL. Активация CD8+ -клеток приводит к появлению ВИЧ-специфических CTL, которые могут дифференцироваться в зависимости от их эффекторных функций.

Целью данного исследования явилось изучение экспрессии CD69-антигена (маркер ранней активации) CD8+ -лимфоцитами периферической крови у ВИЧ-инфицированных.

Материалы и методы. Обследовано 202 ВИЧ-инфицированных пациента на базе Красноярского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД. Средний возраст больных составил $25,8 \pm 2,7$ лет. Диагноз верифицировали методом иммунного блоттинга (тест-система NEW LAV-BLOT1, BIO-RAD, США). Исследования проводили в период до назначения специфической антиретровирусной терапии. Контрольную группу составили 30 здоровых доноров. Количественное определение CD4+ -, CD8+ -клеток осуществляли методом проточной цитометрии. Для оценки экспрессии CD₆₉-антигена цельную гепаринизированную кровь инкубировали при $t 37^{\circ}\text{C}$ в течение 4 ч в присутствии ФГА в концентрации 10 мкг/мл. Далее кровь с активированными Т-лимфоцитами окрашивали трехцветными антителами CD8 – FITC/ CD69 – PE/ CD3 – PerCP(BD). Количество CD3+/CD8+/CD69+ -клеток определяли с помощью трехцветного цитометрического анализатора в программе «CellQuest» на проточном цитометре «FACSCalibur» («Becton Dickinson», США).

Количественные показатели в группах сравнения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (C25 – C75). Статистическая достоверность исследуемых показателей проанализирована с помощью критерия Манна-Уитни (U). Для оценки силы связи между признаками использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты. Изучение экспрессии CD69-антигена на CD₈-клетках периферической крови обнаружило у ВИЧ-инфицированных увеличение относительного количества CD8+ CD69+ -клеток – 12,26 (8,27 – 18,35)% по сравнению с группой контроля – 7,92 (7,12 – 8,98)%, $p < 0,001$.

Исходная группа обследованных ВИЧ-инфицированных была разделена на две подгруппы с низким (менее 8,27%, $n = 49$) и высоким (более 18,35%, $n = 53$) уровнями экспрессии CD69-антигена на CD8+ -

клетках. Основой для разделения послужили значения, выходящие за пределы интерквартильного интервала 25-75%. Установлено, что в группе ВИЧ-инфицированных с высоким содержанием CD8⁺ CD69⁺-клеток статистически значимо снижено как относительное ($22,88 \pm 1,13$), так и абсолютное ($442,50 \pm 31,10$) количество CD4⁺-клеток по сравнению с группой пациентов, имеющих низкое содержание CD8⁺ CD69⁺-клеток ($31,49 \pm 1,05$, $p < 0,001$; $553,50 \pm 31,02$, $p < 0,05$, соответственно). Корреляционный анализ полученных данных также показал, что уровни CD8⁺ CD69⁺-клеток у ВИЧ-инфицированных имеют обратную взаимосвязь с относительным ($r = -0,38$) и абсолютным ($r = -0,27$) количеством CD4⁺-лимфоцитов ($p < 0,001$).

Исходная группа ВИЧ-инфицированных была разделена на 3 подгруппы в зависимости от содержания CD4⁺-клеток согласно классификации ВИЧ-инфекции, CDC. Выявлено, что по мере снижения числа CD4⁺-клеток в периферической крови происходит увеличение количества CD8⁺ CD69⁺-лимфоцитов в сравниваемых группах ВИЧ-инфицированных.

Заключение. Результаты проведенных исследований показали у ВИЧ-инфицированных увеличение относительного количества CD8⁺-клеток, несущих CD69-антиген. Установлена достоверная взаимосвязь между иммунологическими маркерами прогрессии заболевания: по мере снижения числа CD4⁺-клеток в периферической крови наблюдается увеличение количества CD8⁺ CD69⁺-лимфоцитов.