

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.36-002.2-022-018.83-078.33

Цветков В.В.¹, Киселев О. И.¹, Сологуб Т.В.¹, Слита А.В.¹, Токин И.И.^{1,2}, Анхимова Е.С.¹

АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С 1-ГО ГЕНОТИПА

¹ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15/17; ²ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

Дендритные клетки (ДК) являются наиболее профессиональными антигенпрезентирующими клетками, которые одними из первых распознают «сигналы опасности» и запускают высокоспецифические иммунные реакции. Результаты исследований, проведенных некоторыми зарубежными и отечественными авторами, свидетельствуют о нарушении функциональной активности ДК у больных хроническим гепатитом С (ХГС). С целью изучения характера клинического течения различных форм ХГС и оценки способности ДК к презентации антигенов в 2014–2015 гг. в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России проведено простое сравнительное клиническое исследование. Установлено, что ДК, полученные от больных ХГС, характеризуются высокой антигенпрезентирующей активностью, что обусловлено высоким уровнем экспрессии на их поверхности МНС 1-го и 2-го классов. Созревание ДК сопровождается существенным повышением уровней экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR вне зависимости от степени фиброза печени, биохимической активности аланинаминотрансферазы или уровня вирусной нагрузки.

Ключевые слова: дендритная клетка; хронический гепатит С; презентация антигена; главный комплекс гистосовместимости тканей; HLA-A,B,C; HLA-DR.

Для цитирования: Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015; 20 (6): 26–32.

Tsvetkov V.V.¹, Kiselev O.I.¹, Sologub T.V.¹, Slita A.V.¹, Tokin I.I.^{1,2}, Anhimova E.S.¹

ANTIGEN-PRESENTING ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C GENOTYPE 1

¹Research Institute of Influenza, 15/17, Professora Popova str., Saint Petersburg, Saint-Petersburg, Russian Federation, 197376

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 41, Kirochnaya Str., Saint-Petersburg, Russian Federation, 191015

Dendritic cells (DC) are the most professional antigen presenting cells, which are the first to recognize the «danger signals» and trigger highly specific immune responses. However, the results of studies performed by some foreign and domestic authors, testify to a violation of the functional activity of DCs in patients with chronic hepatitis C (CHC). In order to study the nature of the clinical course of various forms of CHC and for the assessment of the capability of DC to antigen presentation in the 2014-2015 in «Research Institute of Influenza» there was performed a simple comparative clinical study. DC obtained from patients with CHC were found to have high antigen-presenting activity due to the presence on their surface a high level of the expression of MHC class I and II. The maturation of DC is accompanied by a significant increase in the levels of expression of HLA-A, B, C and HLA-DR, irrespective of the degree of liver fibrosis, biochemical activity of alanine aminotransferase or level of viral load.

Key words: dendritic cell; chronic hepatitis C; antigen presentation; Major Histocompatibility Complex; HLA-A;B;C; HLA-DR.

For citation: Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. 2015; 20(6): 26–32. (In Russ.)

For correspondence: Tsvetkov V.V., mail: suppcolor@gmail.com

Received 18.09.15

Дендритные клетки (ДК) человека представляют собой гетерогенную популяцию профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК). Главной функцией этих клеток является обеспечение взаимосвязи факторов врожденного и приобретенного иммунитета. При проникновении чужеродного агента в организм ДК одними из первых распознают патогенассоциированные молекулярные паттерны и различные сигналы опасности, что способствует формированию специфического фенотипа зрелых ДК и предопределяет дальнейшее развитие иммунного ответа [1]. Функциональные способности конкретной субпопуляции ДК напрямую зависят от того, в каких условиях и под действием каких сигналов

микроокружения происходило развитие этой субпопуляции [2]. Выделяют как минимум 2 субпопуляции ДК, имеющие различные фенотипы и функциональные особенности [3]. Миелоидные ДК имеют миелоидное происхождение и типичную клеточную морфологию с многочисленными, вуалеподобными цитоплазматическими выступами [3]. Именно эту субпопуляцию называют наиболее профессиональными АПК. Плазмацитоидные ДК в свою очередь имеют лимфоидное происхождение и по своей морфологии очень похожи на секреторные лимфоциты и плазматические клетки. Эту субпопуляцию часто еще называют натуральными продуцентами интерферона за их уникальную способность к секреции большого количества интерферонов 1-го типа в ответ на присутствие в среде вирусов [4].

АПК представляют антигенные структуры другим иммунокомпетентным клеткам. Взаимодей-

Для корреспонденции: Цветков Валерий Владимирович, аспирант, науч. сотр. ФГБУ «НИИ гриппа», e-mail: suppcolor@gmail.com

ствии Т-клеточного рецептора с комплексом МНС – пептид на поверхности ДК является одним из трех основных молекулярных сигналов, необходимых для активации наивных Т-лимфоцитов. Миелоидные ДК способны к более “аккуратной” переработке крупных антигенных структур в короткие пептиды и более эффективной их презентации в составе МНС как 1-го, так и 2-го класса. Презентация коротких антигенных структур (8–1 аминокислота) в составе МНС 1-го класса необходима для активации антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов. Как правило, источником антигенных структур для такого типа презентации служат белки, синтезируемые непосредственно самой ДК. Это могут быть как дефектные рибосомные продукты и продукты альтернативной транскрипции, так и вирусные белки, находящиеся в цитозоле. Процессингу подвергаются также и нативные белки, синтезируемые в ДК, после их посттрансляционной модификации: N-гликозилированные и дезаминированные пептиды, фосфопептиды, пептиды с модифицированными цистеиновыми остатками или пептиды, не подвергшиеся сворачиванию [5]. Презентация коротких антигенных структур (20–24 аминокислоты) в составе МНС 2-го класса необходима для активации наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов, а также для их дальнейшей дифференцировки в Т-хелперы 1-го или 2-го типа, индуцирующие соответственно клеточный или гуморальный иммунный ответ. Источником антигенных структур для такого типа презентации служат экзогенные белки, захваченные ДК извне. Загрузка иммуногенных пептидов в МНС 2-го класса происходит в поздних эндосомальных и лизосомальных компартментах лишь тогда, когда ДК получает сигнал к созреванию [6].

Однако сегодня известно, что ДК могут представлять собой привлекательную мишень для различных возбудителей, в первую очередь вирусов. Так, снижение функциональной активности ДК отмечено у больных с инфекционным мононуклеозом, цитомегаловирусной инфекцией, гриппом типа А и ВИЧ-инфекцией. Заслуженное внимание уделено изучению различных показателей функциональной активности ДК у больных хроническими гепатитами В (ХГВ) и С (ХГС). Доказано, что вирусы гепатитов способны инфицировать ДК человека и вмешиваться в процесс их дифференцировки и созревания [7–9]. Так, при введении методом трансфекции белков вируса гепатита С (НСV) или вектора, кодирующего его гены, в ДК человека, они теряют способность к полному созреванию под действием TNF α или CD40L, что отражается в снижении их аллостимуляторной активности в смешанных лейкоцитарных культурах [10]. Участие белков НCV в регуляции такого важно этапа иммунного ответа, как распознавание “сигналов опасности” и патогенассоциированных молекулярных паттернов, может быть рассмотрено как новый механизм “маскировки” вируса и избегания им иммунного ответа хозяина.

Одним из методов оценки способности ДК к презентации антигенов в составе МНС 1-го и 2-го классов является определение уровней экспрессии на поверхности ДК молекул HLA A,B,C и HLA-DR. С целью изучения характера клинического течения различных форм ХГС и оценки способности ДК, полученных из моноцитов периферической крови больных ХГС, к презентации антигенов в ФГБУ “НИИ гриппа” Минздрава России проведено простое сравнительное клиническое исследование. Для достижения заявленной цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Изучить характер клинического течения заболевания у больных ХГС, инфицированных 1-м генотипом вируса.

2. Изучить способность ДК, полученных от больных ХГС и здоровых добровольцев, к презентации антигенных эпитопов в составе МНС 1-го и 2-го классов путем определения уровней экспрессии на их поверхности HLA A,B,C и HLA-DR;

3. Провести анализ взаимосвязей ведущих клинико-биохимических и инструментальных показателей с показателями функциональной активности дендритных клеток у больных с различными вариантами течения ХГС.

Материалы и методы

В исследование были включены 28 больных ХГС и 15 здоровых добровольцев. Исследуемую группу составили мужчины, больные ХГС ($n = 28$), средний возраст $40,82 \pm 9,11$ года, средний индекс массы тела $26,66 \pm 3,32$. У всех пациентов из данной группы в анамнезе жизни диагностирован ХГС различной давности и выявлен 1-й генотип вируса. У большинства больных (68%, $n = 19$) ХГС был впервые диагностирован менее 5 лет назад. У 21% ($n = 6$) пациентов диагноз был поставлен более 10 лет назад. Ни один больной ранее не получал противовирусной терапии с использованием препаратов интерферона и рибавирина. На момент забора крови для анализа функциональной активности ДК все больные находились в удовлетворительном состоянии и не получали нестероидных противовоспалительных средств, антигистаминных препаратов, системных антибиотиков, противогрибковых и противовирусных препаратов, а также гематологических факторов роста и препаратов крови. Ни у одного больного в анамнезе жизни и при объективном обследовании не выявлено тяжелых сопутствующих заболеваний (в том числе признаков декомпенсации функции печени), хронических заболеваний печени другой этиологии, а также состояний, требующих проведения иммунокорректирующей терапии.

При лабораторном обследовании ни у одного пациента, включенного в исследование, не был обнаружен австралийский антиген (HBsAg) и антитела к ВИЧ (anti-HIV-1,2).

С учетом групп стратификации по активности трансаминаз (менее 80 усл. ед/л или более 80 усл.

Распределение больных ХГС ($n = 28$) по группам стратификации (абс/%)

		Степень фиброза печени			
		F0–2		F3–4	
		18/64		10/36	
		Уровень вирусной нагрузки, РНК HCV, МЕ/мл			
		$\geq 800\ 000$		$< 800\ 000$	
		7/25		6/22	
		$< 800\ 000$		$\geq 800\ 000$	
		11/39		4/14	
		Уровень АЛТ, Ед/л			
		< 80		> 80	
		4/14		3/11	
		< 80		> 80	
		10/36		1/3,5	
		> 80		< 80	
		1/3,5		5/18	
		< 80		> 80	
		2/7		2/7	

ед./л), вирусной нагрузке (800 000 МЕ/мл и более или менее 800 000 МЕ/мл) и степени фиброза печени (F0–2 или F3–4) больные распределились следующим образом (табл. 1).

Группу сравнения составили здоровые добровольцы мужского пола, средний возраст $38,41 \pm 5,45$ года, средний индекс массы тела $25,56 \pm 2,71$. Все субъекты из группы сравнения были обследованы и не имели диагностированных хронических заболеваний печени, а также тяжелых сопутствующих заболеваний других систем органов.

Все лабораторно-инструментальные исследования проводились на базе лицензированных лабораторий ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Клинический анализ крови с определением уровня гемоглобина, количества эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и содержания абсолютного числа нейтрофилов и лимфоцитов, а также определение скорости оседания эритроцитов проводился с использованием гематологического анализатора PCE-90 (ERMA, Япония). Биохимический анализ крови с определением уровней аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), общего билирубина, глюкозы, креатинина, железа, общего белка, альбумина проводился с использованием биохимического анализатора Conelab (Финляндия), тест-система Thermo Fisher Scientific (Финляндия). Определение уровня протромбинового индекса (ПТИ) проводилось с использованием коагулометра Sysmex-CA50 (Япония). Диагностика гепатита С проводилась методом ПЦР (ОТ-ПЦР в режиме реального времени) с определением генотипа вируса и вирусной нагрузки на базе лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Экстракцию нуклеиновых кислот (НК) возбудителей проводили с применением набора «Рибо-преп». Для выявления НК вирусов гепатита использовали тест-систему АмплиСенс HCV-Монитор-FL (производства ЦНИИЭ, Москва), для определения генотипа ВГС – тест-систему АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL, основанные на методе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на приборе

Rotar-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor Gene Q (QIAGEN, Германия). Исключение наличия HBsAg и anti-HIV-1,2 проводилось серологическим методом с использованием тест-системы ImmunoComb (Израиль). Определение степени фиброза печени проводилось методом эластометрии Фиброскан на аппарате FibroScan 502 (ECHOSENS S.A., Франция).

ДК получали из моноцитов периферической крови. Для этого после забора крови на ступенчатом градиенте фиколл-верографина (плотность раствора 1,077 г/мл) выделялся пул мононуклеарных клеток. С помощью осторожной аспирации слоя между плазмой и фиколл-верографином мононуклеарные клетки помещаются в среду для культивирования (RPMI-1640). Индукция дифференцировки моноцитов в ДК достигалась добавлением в среду GM-CSF (800 Ед/мл) и IL-4 (1000 Ед/мл) и последующей инкубацией при $37\ ^\circ\text{C}$, 5% CO_2 в течение 5–6 дней. Для индукции полного созревания ДК инкубировались при $37\ ^\circ\text{C}$, 5% CO_2 в течение 1 сут с добавлением в среду для культивирования фактора созревания (липополисахарид). Определение уровней экспрессии на поверхности незрелых и зрелых ДК молекул HLA-A,B,C и HLA-DR проводилось методом проточной цитометрии с использованием ahHLA-DR, меченных APC, и ahHLA-A,B,C, меченных PE-Cy5.

Математическая и статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программной среды статистического анализа R. В качестве мер центральной тенденции рассчитывались значения среднего арифметического и медианы. В качестве мер изменчивости данных рассчитывались значения дисперсии, среднего квадратичного отклонения и квартилей. Нормальность распределения количественных признаков в выборке оценивалась с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности межгрупповых различий по количественным (метрическим) и порядковым (балльным или полуметрическим) признакам использовались параметрические (t -критерий Стьюдента) и непараметрические (критерий Колмогорова–Смирнова, Манна–Уитни, Уилкоксона) методы. Корреляционный анализ признаков выполнен параметрическим

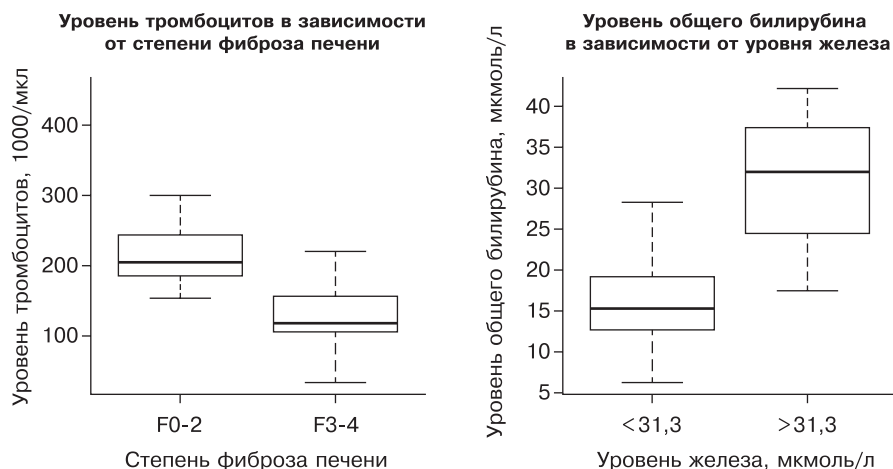


Рис. 1. Уровень тромбоцитов в зависимости от степени фиброза печени – слева; уровень общего билирубина в зависимости от уровня железа – справа.

методом Пирсона и непараметрическим методом Спирмена. В настоящей работе количественные значения приведены в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, а SD – стандартное отклонение, а также в виде Me (медиана с указанием интерквартильного размаха). Уровень значимости принят $\alpha \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Среди наиболее часто встречающихся сопутствующих заболеваний у пациентов основной группы были выявлены: хронический гастрит вне обострения (18%, $n = 5$), гипертоническая болезнь I–II степени (18%, $n = 5$), остеохондроз поясничного отдела позвоночника и грыжа поясничного отдела позвоночника (11%, $n = 3$), мочекаменная болезнь почек (11%, $n = 3$). Реже в анамнезе жизни больных имелись сведения о хроническом бронхите вне обострения (7%, $n = 2$), компенсированном сахарном диабете 2-го типа (7%, $n = 2$), хроническом панкреатите (7%, $n = 2$) и язвенной болезни желудка (3,5%, $n = 1$) или двенадцатиперстной кишки (3,5%, $n = 1$). У 1 больного в анамнезе жизни выявлен острый недифференцированный лейкоз в ремиссии с 1997 г. 1 пациент в 2001 г. перенес инфаркт миокарда. В течение 6 мес до этапа исходной оценки ни один больной не злоупотреблял алкоголем, инъекционными наркотическими препаратами или препаратами, употребляемыми путем вдыхания. Абсолютное большинство пациентов исследуемой группы были некурящими (71%, $n = 20$), у нескольких больных в анамнезе жизни имелись сведения о наличии аллергических реакций (21%, $n = 6$).

Чаще всего больные жаловались на общую слабость, быструю утомляемость (32%, $n = 9$), снижение аппетита (18%, $n = 5$) и дискомфорт/боли в правом подреберье (18%, $n = 5$). У большинства больных с наличием в анамнезе жизни хронического гастрита или язвенной болезни желудка выявлены жалобы на тяжесть/дискомфорт в эпигастральной области (14%, $n = 4$). Пациент с субкомпенсированным цир-

розом печени на момент осмотра предъявлял жалобы на кожный зуд, кровоточивость десен, судороги в икроножных мышцах и одышку при незначительных физических нагрузках.

При объективном осмотре у абсолютного большинства пациентов выявлена гепатомегалия (89%, $n = 25$), у 43% больных на теле обнаружены телеангиоэктазии ($n = 12$), у 21% ($n = 6$) – пальмарная эритема. Реже у пациентов исследуемой группы отмечалось наличие спленомегалии (18%, $n = 5$), иктеричности склер (18%, $n = 5$), у 14% ($n = 4$) больных при пальпации наблюдались дискомфорт/боли в правом подреберье.

При клинико-лабораторном обследовании было установлено, что у большинства пациентов исследуемой группы показатели клинического анализа крови находились в пределах референсных значений. У 8 из 10 больных с фиброзом печени III–IV степени отмечено снижение уровня тромбоцитов. Выявлена обратная средняя достоверная корреляционная связь между количеством тромбоцитов и степенью фиброза печени ($r_{xy} = -0,61$, $p < 0,01$). Среди больных с начальными признаками фиброза печени средний уровень тромбоцитов составил $225,61 \pm 68,32 \cdot 10^9/\text{л}$, а среди пациентов с выраженным фиброзом/циррозом печени — $127,8 \pm 55,71 \cdot 10^9/\text{л}$ (рис. 1). У нескольких больных отмечено снижение уровня лейкоцитов (14%, $n = 4$) и абсолютного содержания нейтрофилов (11%, $n = 3$). У 1 больного с циррозом печени наряду с выраженным снижением уровня тромбоцитов выявлено снижение абсолютного содержания лимфоцитов. У 18% ($n = 5$) пациентов исследуемой группы наблюдалось умеренное повышение скорости оседания эритроцитов.

У абсолютного большинства пациентов исследуемой группы (86%, $n = 24$) отмечено повышение активности трансаминаз, причем у 39% ($n = 11$) больных наблюдалось повышение уровня АЛТ более чем в 2 раза от верхней границы нормы. Средний уровень АЛТ по медиане составил 75,5 Ед/л (интерквар-

Таблица 2

Средняя интенсивность флуоресценции HLA A,B,C и HLA-DR на поверхности незрелых и зрелых ДК в исследуемых группах

Средний показатель	Здоровые добровольцы		Больные ХГС	
	незрелые ДК	зрелые ДК	незрелые ДК	зрелые ДК
HLA-A,B,C				
Me (25%; 75%), MFI	3014,5 (1708,5; 3535)	4141 (3542; 6552,5)	2939,5 (2381,25; 4269,75)	5694,5 (4297,7; 7099,5)
HLA-DR				
Me (25%; 75%), MFI	433 (110,75; 1779)	1102,5 (277,75; 2802)	263 (160,25; 1204)	1877 (689,5; 9832)

Примечание. MFI (mean fluorescence intensity) – средняя интенсивность флуоресценции.

тильный размах от 54 до 104,75 Ед/л). Умеренное повышение уровня АСТ наблюдалось у 71% ($n = 20$) больных, а повышение общего билирубина у 29% ($n = 8$). Выявлена прямая сильная достоверная корреляционная связь между уровнем железа в сыворотке крови и уровнем билирубина ($r_{xy} = 0,69, p < 0,01$). Так, в подгруппе больных с уровнем железа выше референсных значений (более 31,3 мкмоль/л) средний уровень общего билирубина составил $30,88 \pm 10,14$ мкмоль/л, в то время как в подгруппе больных с нормальным уровнем железа в сыворотке крови – $16,05 \pm 5,35$ мкмоль/л (см. рис. 1).

Интересно, что среди больных исследуемой группы степень фиброза печени находилась в прямой корреляционной зависимости от возраста пациента ($r_{xy} = 0,66, p < 0,01$). Средний возраст в подгруппе больных с выраженным фиброзом/циррозом печени составил $48,1 \pm 8,12$ года, а у пациентов с минимальной степенью фиброза печени – лишь $36,78 \pm 6,97$ года. Среди пациентов с фиброзом печени III – IV степени ($n = 10$) у 8 отмечено снижение уровня тромбоцитов, у 7 – снижение ПТИ, у 4 – умеренное повышение уровня прямого билирубина, а у 1 пациента с отечностью нижних конечностей – выраженное снижение уровня альбумина до 29 г/л. Выявлена обратная средняя достоверная корреляционная связь между значением ПТИ и степенью фиброза печени ($r_{xy} = -0,47, p < 0,05$). Так, среди больных с начальными признаками фиброза печени среднее значение ПТИ составило $92,61 \pm 7,2\%$, а среди пациентов с выраженным фиброзом/циррозом печени – $82,2 \pm 15,7\%$. У нескольких больных выявлены биохимические признаки холестаза. Так, умеренное повышение уровня ГГТП отмечено у 50% ($n = 14$) пациентов, причем у трех из них наблюдалось повышение уровней ЩФ и триглицеридов. Выявлена прямая средняя достоверная корреляционная связь между уровнем триглицеридов и ГГТП ($r_{xy} = 0,50, p < 0,01$).

У большинства пациентов ис-

следуемой группы (61%, $n = 17$) наблюдалась низкая вирусная нагрузка (менее 800 000 МЕ/мл). Средний уровень РНК HCV среди больных с низкой вирусной нагрузкой по медиане составил $155275,5$ МЕ/мл (интерквартильный размах от 99 700 до 256 168,5 МЕ/мл), в то время как в подгруппе больных с высокой вирусной нагрузкой – $2 140 000$ МЕ/мл (интерквартильный размах от 1 500 000 до 4 820 000 МЕ/мл). У всех больных выявлен 1b генотип ВГС, у 1 пациен-

та выявлен также минорный субтип 3a. Достоверной корреляции между уровнями вирусной нагрузки и различными показателями клинического или биохимического анализа крови не выявлено.

При фенотипировании ДК, полученных из моноцитов периферической крови здоровых добровольцев, было установлено, что уровни экспрессии (средняя интенсивность флуоресценции) как HLA A,B,C, так HLA-DR существенно различаются в зависимости от стадии дифференцировки ДК (см. рис. 1). Средние уровни экспрессии HLA A,B,C и HLA DR, а также средние показатели доли HLA A,B,C+ и HLA-DR+ ДК приведены в табл. 2.

Средние уровни экспрессии HLA A,B,C и HLA-DR на поверхности незрелых ДК по медиане составили 3014,5 (интерквартильный размах от 1708,5 до 3535) и 433 (интерквартильный размах от 110,75 до 1779) соответственно. При созревании ДК средние уровни экспрессии этих маркеров существенно увеличивались, составив 4142 (интерквартильный размах от 3542 до 6552,5; $p < 0,05$) и 1102,5 (интерквартильный размах от 277,75 до 2802) соответственно (рис. 2).

Средние уровни экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности незрелых ДК, полученных от больных ХГС, были сопоставимы с показателями в контрольной группе и составили 2939,50 (интерквартильный размах от 2381,25 до 4269,75) и

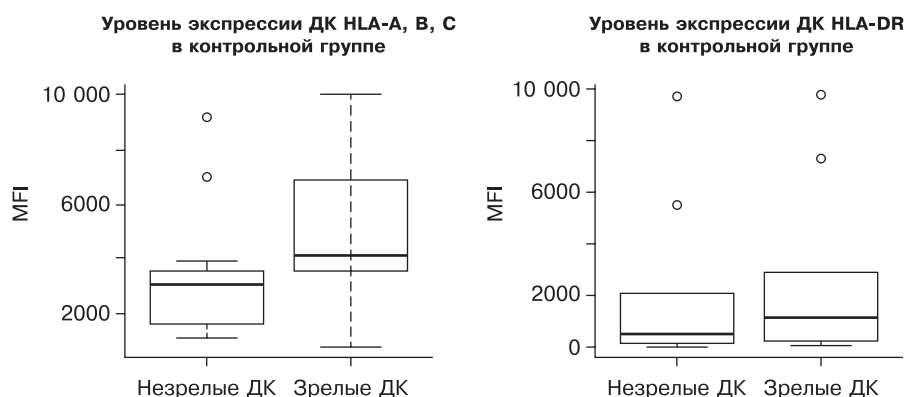


Рис. 2. Средняя интенсивность флуоресценции HLA A,B,C и HLA-DR на поверхности незрелых и зрелых ДК, полученных от здоровых добровольцев.

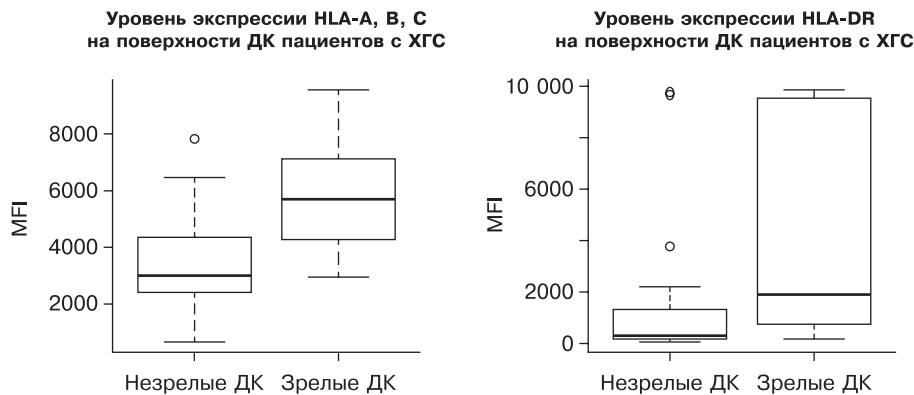


Рис. 3. Средняя интенсивность флуоресценции HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности незрелых и зрелых ДК, полученных от больных ХГС.

263 (интерквартильный размах от 160,25 до 1204) соответственно. Созревание ДК, полученных от больных ХГС, также сопровождалось увеличением уровней экспрессии HLA A,B,C ($p < 0,01$) и HLA-DR ($p < 0,01$). Средние уровни по медиане составили 5694,50 (интерквартильный размах от 4297,75 до 7099,5) и 1877 (интерквартильный размах от 689,5 до 9506,25) соответственно (рис. 3). Статистически значимых различий между уровнями экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR на поверхности ДК, полученных от здоровых добровольцев и больных ХГС, выявлено не было.

Дисперсионный анализ полученных данных в группе больных ХГС позволил выявить влияние степени фиброза печени на уровень экспрессии HLA-DR на поверхности незрелых ДК ($p < 0,05$). Так, в подгруппе больных с незначительной степенью фиброза печени показатель средней интенсивности флуоресценции HLA-DR был существенно ниже, чем среди пациентов с выраженным фиброзом/циррозом печени, и составил 206 (интерквартильный размах от 138,75 до 583) против 653,5 (интерквартильный размах от 288,5 до 2050) соответственно.

Результаты исследований, проведенных некоторыми зарубежными и отечественными авторами, свидетельствуют о нарушении антигенпрезентирующей активности ДК у больных ХГС. Так, миелоидные ДК, выделенные из периферической крови больных ХГС, характеризуются снижением способности к презентации антигенов в составе МНС 1-го и 2-го классов за счет снижения уровня экспрессии на своей поверхности молекул HLA-A,B,C и HLA-DR [11]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было показано, что гепатоциты и АПК, экспрессирующие Сog- и NS5A- белки ВГС, характеризуются низким уровнем экспрессии катепсина С за счет ингибирования интерферонрегулирующего фактора 1 (IRF-1) и USF-1 [12]. Катепсин С в свою очередь является лизосомальной цистеинпротеазой, регулирующей презентацию комплекса HLA-DR – пептид путем деградации инвариантной цепи CD74. Известно, что результат презентации антигена будет зависеть от количества комплексов МНС – пептид на поверх-

ности ДК и силы межклеточного взаимодействия. Так, в исследованиях *in vitro* было показано, что высокоаффинное взаимодействие трансгенного Т-клеточного рецептора с неизменным лигандом (цитохром С моли/ММС) коррелирует с длительной активацией киназы MAPK/ERK с последующей дифференцировкой наивного Т-хелпера в Т-хелпер 1-го типа [13]. В свою очередь низкоаффинное взаимодействие трансгенного Т-клеточного рецептора с измененным пептидным лигандом K99R коррелирует с короткой ак-

тивацией киназы MAPK/ERK с последующей дифференцировкой наивного Т-хелпера в Т-хелпер 2-го типа [14].

Тем не менее полученные нами данные не согласуются с данными некоторых других авторов, свидетельствующими о снижении антигенпрезентирующей способности ДК у больных ХГС. Результаты проведенного исследования не выявили каких-либо существенных различий в антигенпрезентирующей активности ДК у больных ХГС и здоровых добровольцев.

Выводы

1. При клинико-лабораторном обследовании пациентов с различными вариантами течения ХГС выявлена обратная средняя достоверная корреляционная связь между количеством тромбоцитов и уровнем ПТИ, а также степенью фиброза печени ($r_{xy} = -0,61, p < 0,01$; $r_{xy} = -0,47, p < 0,05$ соответственно). Установлено, что уровень общего билирубина в сыворотке крови больных ХГС находится в прямой корреляционной зависимости от уровня железа ($r_{xy} = 0,69, p < 0,01$).

2. ДК, полученные из моноцитов периферической крови больных ХГС, характеризуются высокой антигенпрезентирующей активностью, что обусловлено наличием на их поверхности большого количества молекул МНС 1-го и 2-го классов.

3. Установлено, что созревание ДК сопровождается существенным повышением уровней экспрессии HLA-A,B,C и HLA-DR вне зависимости от степени фиброза печени, биохимической активности аланинаминотрансферазы или уровня вирусной нагрузки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Medzhitov R., Janeway C.A. Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. *Science*. 2002; 296: 298–300.
2. Цветков В.В., Сологуб Т.В., Токин И.И. Биология дендритных клеток человека и их роль в инфекционной патологии. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2014; 3: 68–74.
3. Katsuki S., Shigeharu F. Dendritic cells-nature and classification. *Allergol. Int.* 2007; 56: 183–91.

4. Liu Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 275–306.
5. Trombetta E.S., Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 975–1028.
6. Inaba K., Turley S., Iyoda T., Yamaide F., Shimoyama S., Reis e Sousa C. et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 927–36.
7. Tsubouchi E., Akbar S.M.F., Murakami H., Horiike N., Onji M. Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus (HCV) RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 137 (2): 417–23.
8. Takaki A., Tatsukawa M., Iwasaki Y., Koike K., Noguchi Y., Shiraha H. et al. Hepatitis C virus NS4 protein impairs the Th1 polarization of immature dendritic cells. *J. Viral Hepat.* 2010; 17: 555–62.
9. Stranska R., Florentin J., Dental C., Aouar B., Gondois-Rey F., Durantel D. et al. Hepatitis C virus fails to activate NF-kappaB signaling in plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* 2012; 86 (2): 1090–6.
10. Sarobe P., Lasarte J.J., Zabaleta A., Arribillaga L., Arina A., Melero I. et al. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J. Virol.* 2003; 77: 10 862–71.
11. Zimmermann M., Flechsig C., La Monica N., Tripodi M., Adler G., Dikopoulos N. Hepatitis C virus core protein impairs in vitro priming of specific T cell responses by dendritic cells and hepatocytes. *J. Hepatol.* 2008; 48: 51–60.
12. Mazumdar B., Kim H., Meyer K., Bose S.K., Di Bisceglie A.M., Ray R., Hofst D.F. Hepatitis C virus-mediated inhibition of cathepsin S increases invariant-chain expression on hepatocyte surface. *J. Virol.* 2012; 86 (18): 9919–28.
13. Bottomly K., Jorritsma P.J., Brogdon J.L. Role of TCR-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the regulation of early IL-4 expression in naive CD4 T cells. *J. Immunol.* 2003; 170 (5): 2427–34.
14. Tao X., Grant C., Constant S., Bottomly K. Induction of IL-4-producing CD4 T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J. Immunol.* 1997; 158 (9): 4237–44.
6. Inaba K., Turley S., Iyoda T., Yamaide F., Shimoyama S., Reis e Sousa C. et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 927–36.
7. Tsubouchi E., Akbar S.M.F., Murakami H., Horiike N., Onji M. Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus (HCV) RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 137 (2): 417–23.
8. Takaki A., Tatsukawa M., Iwasaki Y., Koike K., Noguchi Y., Shiraha H. et al. Hepatitis C virus NS4 protein impairs the Th1 polarization of immature dendritic cells. *J. Viral Hepat.* 2010; 17: 555–62.
9. Stranska R., Florentin J., Dental C., Aouar B., Gondois-Rey F., Durantel D. et al. Hepatitis C virus fails to activate NF-kappaB signaling in plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* 2012; 86 (2): 1090–6.
10. Sarobe P., Lasarte J.J., Zabaleta A., Arribillaga L., Arina A., Melero I. et al. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J. Virol.* 2003; 77: 10 862–71.
11. Zimmermann M., Flechsig C., La Monica N., Tripodi M., Adler G., Dikopoulos N. Hepatitis C virus core protein impairs in vitro priming of specific T cell responses by dendritic cells and hepatocytes. *J. Hepatol.* 2008; 48: 51–60.
12. Mazumdar B., Kim H., Meyer K., Bose S.K., Di Bisceglie A.M., Ray R., Hofst D.F. Hepatitis C virus-mediated inhibition of cathepsin S increases invariant-chain expression on hepatocyte surface. *J. Virol.* 2012; 86 (18): 9919–28.
13. Bottomly K., Jorritsma P.J., Brogdon J.L. Role of TCR-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the regulation of early IL-4 expression in naive CD4 T cells. *J. Immunol.* 2003; 170 (5): 2427–34.
14. Tao X., Grant C., Constant S., Bottomly K. Induction of IL-4-producing CD4 T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J. Immunol.* 1997; 158 (9): 4237–44.

Поступила 18.09.15

REFERENCES

1. Medzhitov R., Janeway C.A. Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. *Science.* 2002; 296: 298–300.
2. Tsvetkov V.V., Sologub T.V., Tokin I.I. Biology of human dendritic cells and their role in infectious diseases. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik im. akademika I.P. Pavlova.* 2014; 3: 68–74.
3. Katsuaki S., Shigeharu F. Dendritic cells-nature and classification. *Allergol. Int.* 2007; 56: 183–91.
4. Liu Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 275–306.
5. Trombetta E.S., Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 975–1028.

Сведения об авторах:

Киселев Олег Иванович, акад. РАН, проф., директор ФГБУ «НИИ гриппа», e-mail: office@influenza.spb.ru; **Сологуб Тамара Васильевна**, доктор мед. наук, проф. заместитель директора по научной и клинической работе ФГБУ «НИИ гриппа», e-mail: sologub@influenza.spb.ru; **Слита Александр Валентинович**, канд. биол. наук, зав. лаб. клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа», e-mail: alexander.slita@influenza.spb.ru; **Токин Иван Иванович**, канд. мед. наук, зав. отд.-нием экспериментальной терапии вирусных гепатитов ФГБУ «НИИ гриппа», доцент каф. инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова», e-mail: ivan.i.tokin@rambler.ru; **Анхимова Елена Степановна**, канд. мед. наук, сотр. клинико-диагностической лаб. ФГБУ «НИИ гриппа», e-mail: elena.ankhimova@influenza.spb.ru