

Субпопуляционный состав Т-киллеров крови у пациентов с гепатитом С с 1-м или 3-м генотипом

М.А. Черепнин, В.В. Цуканов[✉], gastro@impn.ru, А.А. Савченко, А.В. Васютин, А.Г. Борисов, В.Д. Беленюк, Ю.Л. Тонких

Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3 «Г»

Резюме

Введение. Несмотря на большое внимание к патогенезу хронического вирусного гепатита С (ХВГС), многие аспекты иммунного реагирования при этой патологии остаются неясными.

Цель. Изучить субпопуляционный состав Т-цитотоксических клеток (Т-киллеров) крови методом проточной цитометрии в зависимости от выраженности клинико-морфологических проявлений ХВГС с 1-м или 3-м генотипом.

Материалы и методы. Клиническое, лабораторное обследование, определение фиброза печени методом эластометрии по шкале METAVIR и исследование субпопуляционного состава Т-цитотоксических клеток в крови было проведено у 144 больных ХВГС, из них у 74 пациентов с 1-м генотипом и у 70 лиц с 3-м генотипом, и у 20 человек контрольной группы. Исследование субпопуляционного состава Т-цитотоксических клеток в крови проводилось на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, USA) с определением маркеров CD3, CD8, CD45R0 и CD62L.

Результаты. Изменения субпопуляционного состава Т-цитотоксических клеток крови были в большей степени ассоциированы с выраженностью фиброза печени у пациентов с 1-м и 3-м генотипами ХВГС, чем с воспалительной активностью и вирусной нагрузкой. У пациентов с 3-м генотипом ХВГС регистрировалось выраженное снижение содержания TEMRA Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁻) и Т-цитотоксических клеток эффекторной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁻) у больных с фиброзом печени F3–F4 по METAVIR в сравнении с лицами с фиброзом печени F0–F1 по METAVIR (критерий Краскела – Уоллиса соответственно $p = 0,02$ и $p = 0,04$). У лиц с 1-м генотипом ХВГС аналогичные процессы были выражены в меньшей степени.

Заключение. Нами получена ассоциация ухудшения показателей субпопуляционного состава Т-цитотоксических клеток крови у больных ХВГС при возрастании выраженности фиброза печени, которая имела некоторые отличия у пациентов с 1-м и 3-м генотипом.

Ключевые слова: вирусный гепатит С, Т-цитотоксические клетки, фиброз печени, вирусная нагрузка, воспалительная активность

Для цитирования: Черепнин М.А., Цуканов В.В., Савченко А.А., Васютин А.В., Борисов А.Г., Беленюк В.Д., Тонких Ю.Л. Субпопуляционный состав Т-киллеров крови у пациентов с гепатитом С с 1-м или 3-м генотипом. *Медицинский совет.* 2023;17(8):142–149. <https://doi.org/10.21518/ms2023-139>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Subpopulation composition of blood T-killers in patients with hepatitis C with genotype 1 or 3

Mikhail A. Cherepnin, Vladislav V. Tsukanov[✉], gastro@impn.ru, Andrei A. Savchenko, Alexander V. Vasyutin, Alexander G. Borisov, Vasilij D. Belenyuk, Julia L. Tonkikh

Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Separate Subdivision "Scientific Research Institute of medical problems of the North"; 3G, Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, 660022, Russia

Abstract

Introduction. Despite great attention to the pathogenesis of chronic viral hepatitis C (CVHC), many aspects of the immune response in this pathology remain unclear.

Aim. To study the subpopulation composition of blood cytotoxic T cells by flow cytometry, depending on the severity of clinical and morphological manifestations of CVHC with genotype 1 or 3.

Materials and methods. Clinical, laboratory examinations, determination of liver fibrosis by elastometry using the METAVIR scale and study of the subpopulation composition of cytotoxic T cells in the blood were carried out in 144 patients with CVHC, including 74 patients with genotype 1 and 70 individuals with genotype 3, and in 20 people of the control group. The study of the subpopulation composition of cytotoxic T cells in the blood was carried out on a flow cytometer Navios (Beckman Coulter, USA) with the determination of CD3, CD8, CD45R0 and CD62L markers.

Results. Changes in the subpopulation composition of blood cytotoxic T cells were more associated with the severity of liver fibrosis in patients with 1 and 3 genotypes of CVHC, than with inflammatory activity and viral load. In patients with CVHC genotype 3, a marked decrease in the content of TEMRA T-cytotoxic cells (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁻) and effector memory T-cytotoxic cells (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁻) was registered in patients with METAVIR liver fibrosis stage F3–F4 in comparison with persons with METAVIR liver fibrosis stage F0–F1 (Kruskal-Wallis test, respectively, $p = 0.02$ and $p = 0.04$). In persons with CVHC genotype 1, similar associations were expressed to a lesser extent.

Conclusion. We obtained an association of deterioration in the indices of the blood cytotoxic T cells subpopulation in patients with CVHC with an increase in the severity of liver fibrosis, which had some differences in patients with genotypes 1 and 3.

Keywords: Viral hepatitis C, cytotoxic T-cells, liver fibrosis, viral load, inflammatory activity

For citation: Cherepnin M.A., Tsukanov V.V., Savchenko A.A., Vasyutin A.V., Borisov A.G., Belenyuk V.D., Tonkikh J.L. Subpopulation composition of blood T-killers in patients with hepatitis C with genotype 1 or 3. *Meditsinskiy Sovet.* 2023;17(8):142–149. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/ms2023-139>.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в мире насчитывается около 70 млн больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС). Эти пациенты имеют значительный риск развития воспаления печени, фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [1]. Поскольку вирус сам по себе не является цитопатическим, повреждение печени при ХВГС обуславливают иммуноопосредованные механизмы [2]. Обнаружение вируса С клетками иммунной системы активирует сигнальные пути, что запускает врожденный иммунный ответ против вируса. Клетки иннатной иммунной системы, включая естественные киллеры, дендритные клетки и клетки Купфера, взаимодействуют с инфицированными гепатоцитами и презентуют вирусные антигены Т- и В-клеткам, эффекторные ответы которых способствуют исходу инфекции [3]. Центральная роль в противовирусном иммунитете принадлежит цитотоксическим Т-клеткам (Т-киллерам, CD3⁺CD8⁺) [4]. Несмотря на большое внимание к патогенезу ХВГС, многие аспекты иммунного реагирования при этой патологии остаются недостаточно изученными [5]. Известно, что ХВГС с 1-м и 3-м генотипом может иметь отличия в клиническом течении [6]. Но сравнительные работы по изучению субпопуляционного состава цитотоксических Т-клеток у этих пациентов практически отсутствуют.

Цель – изучить субпопуляционный состав Т-цитотоксических клеток крови методом проточной цитометрии в зависимости от выраженности клинико-морфологических проявлений ХВГС с 1-м или 3-м генотипом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе терапевтического отделения клиники НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН и ООО «Институт клинической иммунологии» (г. Красноярск). Исследование субпопуляционного состава Т-цитотоксических клеток в крови методом проточной цитометрии было проведено у 144 больных ХВГС, из них у 74 пациентов с 1-м генотипом (38 мужчин и 36 женщин, средний возраст 44,1 года) и у 70 лиц с 3-м генотипом (36 мужчин и 34 женщины, средний возраст 43,7 года) и у 20 человек контрольной группы.

Критерием включения был объективно диагностированный ХВГС с 1-м или 3-м генотипом у пациентов в возрасте от 18 до 60 лет, подписавших информированное согласие на обследование.

Критериями исключения из исследования были:

- 1) возраст младше 18 лет и старше 60 лет;
- 2) ВИЧ-инфекция;

- 3) онкологические заболевания;
- 4) 2-й, 4–7-й генотипы ХВГС;
- 5) другие хронические заболевания печени различной этиологии (другие вирусные гепатиты, описторхоз, неалкогольная жировая болезнь печени, алкогольная болезнь печени, аутоиммунный гепатит, болезнь Вильсона – Коновалова, гемохроматоз и др.);
- 6) туберкулез;
- 7) беременность;
- 8) выраженные хронические заболевания различных органов и систем;
- 9) пациенты, отказавшиеся принять участия в научном исследовании.

Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц (10 мужчин и 10 женщин, средний возраст 43,3 года) с исключенными во время профилактического осмотра выраженными хроническими заболеваниями различных органов и систем, отсутствием жалоб на состояние здоровья, имеющих нормальные показатели клинического и биохимического анализов крови, с отсутствием в крови маркеров вирусного гепатита В и С и отрицавшими в анамнезе сведения о злоупотреблении алкоголем.

Диагноз ХВГС устанавливали на основании эпидемиологических и клинико-лабораторных данных при обнаружении специфических серологических маркеров ХВГС и РНК вируса гепатита С, согласно рекомендациям Европейской ассоциации по изучению печени (EASL) [7, 8]. Определение содержания РНК вируса осуществляли методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на приборе Biorad CFX96 Real Time System (BioRad Laboratories, США) с применением тест-системы Abbott RealTime HCV test[®] (Abbott, США). Генотип вируса гепатита С определяли с помощью набора VERSANT[®] HCV Amplification 2.0 (LiPA; Siemens, Германия).

Для диагностики сопутствующих изменений и осложнений всем пациентам выполняли клинический и биохимический анализы крови, а также ультразвуковое исследование печени и поджелудочной железы. Биохимическое исследование крови включало определение трансаминаз (АЛТ и АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамил транспептидазы (ГГТП), общего и прямого билирубина, общего белка, альбумина, железа, меди, при необходимости осуществлялось определение церулоплазмина. Уровень активности ХВГС определяли по содержанию трансаминаз в крови на основании Лос-Анджелесской классификации гепатита [9]. При подозрении на наличие аутоиммунного гепатита проводилось измерение в крови концентрации IgG и специфических аутоантител (ASMA; LKM-1; anti-LC1).

Степень фиброза печени у пациентов оценивали методом эластометрии с применением ультразвуковой системы Aixplorer (Франция), которая использует для получения изображения сдвиговые волны (Shear Wave Imaging). Расчет модуля эластичности (жесткости печени) осуществлялся по формуле: $E = 3 \cdot \rho \cdot V_s^2$, где E – модуль эластичности в килопаскалях (кПа), ρ – плотность в кг/м³ и V_s – скорости распространения сдвиговой волны в м/с. Жесткость печени или значения V_s постепенно увеличиваются с прогрессированием фиброза печени и считаются эффективными показателями для постановки диагноза фиброза печени и цирроза печени в частности. Оценка фиброза проводилась по шкале METAVIR [10]. Выделялось 4 степени фиброза в зависимости от выявляемых показателей эластичности печени:

F0 – фиброз отсутствует ($\leq 5,8$ кПа);

F1 – портальный и перипортальный фиброз без септ (5,9–7,2 кПа);

F2 – портальный и перипортальный фиброз с единичными септами (7,3–9,5 кПа);

F3 – портальный и перипортальный фиброз со множественными септами (мостовидными), с порто-портальными и портоцентральными септами (9,6–12,5 кПа);

F4 – цирроз ($\geq 12,6$ кПа).

Исследование субпопуляционного состава Т-цитотоксических клеток было осуществлено 144 больным ХВГС и 20 здоровым лицам контрольной группы методом прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченных флуоресцентными красителями с определением маркеров CD3, CD8, CD45R0 и CD62L. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [11]. Пробоподготовку выполняли по стандартной методике [12]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, USA) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН. Обработку полученных цитофлуориметрических результатов осуществляли с помощью программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 (Beckman Coulter, USA). Т-цитотоксические клетки в зависимости от уровней экспрессии CD45R0 (маркер клеток памяти) и CD62L (L-селектин) разделяли на 4 основные субпопуляции: наивные клетки (с фенотипом CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁺), клетки центральной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁺), клетки эффекторной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁻) и терминально-дифференцированные эффекторные клетки (TEMRA, CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁻). В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

В соответствии со ст. 24 Конституции РФ и Хельсинкской Декларацией о проведении научных исследований все обследованные были ознакомлены с целями, методами и возможными осложнениями в ходе исследований и подписали информированные согласия на участие в обследованиях. Исследование проводилось с разрешения этического комитета ФИЦ КНЦ СО РАН (протокол №4 от 02.08.2019).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США). Результаты исследования были представлены для выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения, с медианой (Me) и интерквартильным интервалом (C_{25} – C_{75}). Достоверность между количественными показателями независимых выборок оценивали с помощью критериев Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы определили субпопуляционный состав Т-цитотоксических клеток в зависимости от стадии фиброза по METAVIR у обследованных пациентов. Нами не было обнаружено отчетливых взаимосвязей наивных Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁺) в крови с выраженностью фиброза печени как у пациентов с 1-м генотипом, так и у больных с 3-м генотипом ХВГС (табл. 1).

Содержание Т-цитотоксических клеток центральной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁺) было снижено у пациентов с 1-м генотипом ХВГС и фиброзом печени F3–F4 по METAVIR в сравнении с лицами с фиброзом печени F0–F1 по METAVIR и здоровыми лицами. У пациентов с 3-м генотипом ХВГС аналогичные закономерности не регистрировались (табл. 1).

Содержание Т-цитотоксических клеток эффекторной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁻) не имело существенных колебаний в зависимости от выраженности фиброза печени у больных с 1-м генотипом ХВГС. У пациентов с 3-м генотипом доля Т-цитотоксических клеток эффекторной памяти достоверно снижалась у лиц с фиброзом печени F3–F4 по METAVIR в сравнении с пациентами с фиброзом печени F0–F1 по METAVIR. Эти данные верифицировались критерием Краскела – Уоллиса у больных с 3-м генотипом ХВГС ($p = 0,04$; табл. 1).

Содержание TEMRA Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁻) значительно снижалось как у пациентов с 1-м генотипом, так и у больных с 3-м генотипом ХВГС и фиброзом печени F3–F4 по METAVIR в сравнении с лицами с фиброзом печени F0–F1 по METAVIR. При этом критерий Краскела – Уоллиса показывал более очевидную взаимосвязь этих показателей у больных с 3-м генотипом ($p = 0,02$) в сравнении с пациентами с 1-м генотипом ХВГС ($p = 0,11$; табл. 1).

Тенденции, обнаруженные нами при изучении субпопуляционного состава Т-цитотоксических клеток в зависимости от активности воспаления, отличались от взаимосвязи иммунологических показателей с выраженностью фиброза печени. В частности, содержание Т-цитотоксических клеток центральной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁺), Т-цитотоксических клеток эффекторной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁻) и TEMRA Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁻) не снижалось у больных с величиной АЛТ больше 5 норм в сравнении с пациентами

● **Таблица 1.** Субпопуляционный состав Т-цитотоксических клеток в крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С с 1-м и 3-м генотипами в зависимости от стадии фиброза печени по METAVIR (%), Me ($C_{25}-C_{75}$)

● **Table 1.** Subpopulation composition of blood T-cytotoxic cells in patients with chronic viral hepatitis C with genotypes 1 and 3 depending on the stage of liver fibrosis according to METAVIR, Me ($C_{25}-C_{75}$)

Пациенты	Фиброз печени по METAVIR	Наивные Т-цитотоксические клетки CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁺	Т-цитотоксические клетки центральной памяти CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁺	Т-цитотоксические клетки эффекторной памяти CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁻	TEMRA Т-цитотоксические клетки CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ CD62L ⁻
С 1-м генотипом ХВГС (n = 74)	F0-F1 (n = 45)	4,54 (2,71-4,77)	6,81 (4,29-9,73)	10,63 (5,77-11,27)	8,51 (5,78-11,8)
	F2 (n = 14)	3,27 (0,98-5,83)	7,95 (4,55-13,00)	7,38 (6,12-11,45)	10,88 (5,68-12,58)
	F3-F4 (n = 15)	4,62 (1,75-4,91)	4,84 (3,11-7,89)	9,78 (4,64-17,19)	4,96 (3,45-9,96)
С 3-м генотипом ХВГС (n = 70)	F0-F1 (n = 28)	4,04 (3,12-4,82)	7,03 (5,97-11,89)	11,02 (5,90-15,23)	10,42 (8,02-12,37)
	F2 (n = 16)	4,35 (2,91-5,11)	8,99 (7,28-11,00)	6,88 (6,26-8,16)	9,31 (4,73-10,14)
	F3-F4 (n = 26)	4,82 (2,27-6,39)	9,81 (3,78-9,74)	6,97 (2,77-10,87)	5,99 (2,54-10,32)
Здоровые лица (n = 20)		2,20 (1,37-2,39)	9,68 (6,73-12,84)	6,72 (5,05-11,93)	6,68 (5,96-8,99)
P_{1-3}		0,82	0,04	0,6	0,02
P_{2-3}		0,23	0,01	0,22	0,01
P_{4-6}		0,51	0,18	0,03	0,003
P_{5-6}		0,88	0,69	0,68	0,04
P_{1-7}		<0,001	0,01	0,04	0,28
P_{2-7}		0,25	0,28	0,71	0,04
P_{3-7}		0,04	0,001	0,57	0,33
P_{4-7}		0,002	0,24	0,04	0,02
P_{5-7}		0,03	0,78	0,64	0,05
P_{6-7}		0,003	0,04	0,55	0,74
P_{1-2-3} (Краскела – Уоллиса)		0,3	0,19	0,23	0,11
P_{4-5-6} (Краскела – Уоллиса)		0,71	0,38	0,04	0,02

Примечание. Достоверность различий показателей между 2 группами рассчитана с использованием критерия Манна – Уитни, достоверность различий между несколькими группами – с помощью критерия Краскела – Уоллиса.

с содержанием АЛТ от 1 до 3 норм в обеих группах пациентов с ХВГС, а у больных с 3-м генотипом содержание TEMRA Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁻) даже увеличивалось у пациентов с максимальной воспалительной активностью. Только при исследовании содержания наивных Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁺) мы зафиксировали достоверное снижение количества этих клеток у больных с 1-м генотипом ХВГС с содержанием АЛТ в крови выше 5 норм в сравнении с лицами с уровнем АЛТ от 1 до 3 норм (табл. 2).

Содержание субпопуляций Т-цитотоксических клеток как у пациентов с 1-м генотипом, так и у больных с 3-м генотипом ХВГС не снижалось при увеличении вирусной нагрузки. Более того, содержание Т-цитотоксических наивных клеток (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁺) в обеих группах больных ХВГС отчетливо превышало показатель здоровых лиц. Содержание Т-цитотоксических клеток центральной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁺) у больных с 3-м генотипом ХВГС с высокой вирусной нагрузкой значительно превышало результат обследования лиц с низкой вирусной нагрузкой. Концентрация Т-цитотоксических клеток

эффекторной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁻) в обеих группах больных ХВГС с высокой вирусной нагрузкой не отличалась от показателя здоровых лиц. Содержание TEMRA Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁻CD62L⁻) также не имело тенденции к снижению как у пациентов с 1-м генотипом, так и у больных с 3-м генотипом ХВГС у лиц с высокой вирусной нагрузкой в сравнении с пациентами с низкой вирусной нагрузкой (табл. 3). Полученные результаты позволяют считать, что дисфункция Т-цитотоксических клеток в большей степени ассоциирована с выраженностью фиброза печени и не регистрируется у больных ХВГС как с 1-м, так и с 3-м генотипом, в зависимости от воспалительной активности и величины вирусной нагрузки.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время принято считать, что хронизация вирусного гепатита С в значительной степени объясняется дисфункцией CD3⁺CD8⁺ клеток, которая проявляется снижением пролиферативной функции, способности

● **Таблица 2.** Субпопуляционный состав Т-цитотоксических клеток в крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С с 1-м и 3-м генотипами в зависимости от уровня АЛТ в крови (%), Me (C₂₅–C₇₅)

● **Table 2.** Subpopulation composition of blood T-cytotoxic cells in patients with chronic viral hepatitis C with genotypes 1 and 3 depending on the level of ALT in the blood, Me (C₂₅–C₇₅)

Пациенты	Уровень АЛТ в кратности верхнего уровня нормы	Наивные Т-цитотоксические клетки CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁺	Т-цитотоксические клетки центральной памяти CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁺	Т-цитотоксические клетки эффекторной памяти CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD62L ⁻	TEMRA Т-цитотоксические клетки CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁻ CD62L ⁻
С 1-м генотипом ХВГС (n = 74)	1–3 нормы (n = 32)	4,07 (3,23–4,91)	6,78 (4,29–11,10)	9,78 (5,14–11,02)	9,96 (5,88–12,58)
	3–5 норм (n = 21)	3,74 (2,02–4,62)	4,44 (2,69–7,49)	10,70 (6,32–22,80)	5,43 (3,15–8,04)
	Более 5 норм (n = 21)	2,49 (1,35–5,25)	6,57 (2,69–9,19)	8,18 (5,22–9,07)	9,22 (7,14–12,40)
С 3-м генотипом ХВГС (n = 70)	1–3 нормы (n = 24)	4,43 (2,53–6,32)	8,54 (5,51–11,76)	6,74 (3,84–11,44)	9,69 (5,59–12,28)
	3–5 норм (n = 21)	4,70 (3,11–5,73)	8,01 (5,01–11,89)	7,36 (3,27–11,34)	7,62 (6,67–13,45)
	Более 5 норм (n = 25)	5,27 (4,70–6,06)	10,72 (6,50–15,82)	8,77 (7,33–11,52)	12,04 (9,82–14,23)
Здоровые лица (n = 20)		2,20 (1,37–2,39)	9,68 (6,73–12,84)	6,72 (5,05–11,93)	6,68 (5,96–8,99)
P ₁₋₃		0,02	0,81	0,23	0,92
P ₂₋₃		0,37	0,14	0,04	0,02
P ₄₋₆		0,43	0,21	0,05	0,02
P ₅₋₆		0,52	0,14	0,27	0,001
P ₁₋₇		0,001	0,05	0,03	0,03
P ₂₋₇		0,007	0,003	0,02	0,52
P ₃₋₇		0,32	0,03	0,84	0,02
P ₄₋₇		0,001	0,65	>0,9	0,03
P ₅₋₇		<0,001	0,42	0,57	0,2
P ₆₋₇		<0,001	0,85	0,26	0,002
P ₁₋₂₋₃ (Краскела – Уоллиса)		0,12	0,66	0,39	0,05
P ₄₋₅₋₆ (Краскела – Уоллиса)		0,56	0,36	0,26	0,04

Примечание. Достоверность различий показателей между 2 группами рассчитана с использованием критерия Манна – Уитни, достоверность различий между несколькими группами – с помощью критерия Краскела – Уоллиса.

продуцировать провоспалительные цитокины и цитолитической функции [13, 14]. На этот процесс может влиять также массивный апоптоз Т-клеток в печени у больных ХВГС [15]. Феномен дисфункции Т-клеток при ХВГС называют также истощением Т-клеток [16]. Существуют 2 основных механизма недостаточности CD3⁺CD8⁺ клеток у больных ХВГС [5]. Во-первых, это хроническая стимуляция антигеном, которая приводит к глубокой потере функции Т-цитотоксических клеток [17, 18]. Длительная антигенная стимуляция способствует внесению изменений в транскрипционную и эпигенетическую программу Т-клеток, что приводит к закреплению снижения функции CD3⁺CD8⁺ клеток [19, 20]. Второй причиной истощения Т-клеток являются мутации, способствующие ускользанию вируса от действия иммунных механизмов [21].

В нашей работе мы обнаружили, что снижение содержания TEMRA Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD45RO⁻CD62L⁻) в большей степени ассоциировано с выраженностью фиброза печени, чем с активностью воспаления и вирусной нагрузкой. С одной стороны, это

можно объяснить тем, что развитие фиброза печени свидетельствует о длительности заболевания, является эквивалентом стойкой антигенной нагрузки и поэтому в большей степени связано с истощением Т-клеток. С другой стороны, ранее было показано, что апоптоз клеток печени у больных ХВГС имел положительную корреляцию с градацией гистологической активности, но не был ассоциирован с уровнем воспалительной активности и вирусной нагрузкой [22]. В целом роль Т-клеточного ответа в генезе фиброза печени у больных ХВГС нуждается в дальнейшем изучении [23].

В настоящее время сохраняется интерес к сравнительному изучению течения ХВГС у пациентов с разными генотипами вируса. Превалирует точка зрения, что 3-й генотип имеет более агрессивное течение в сравнении с 1-м генотипом ХВГС [24–26]. Но сравнительные современные исследования субпопуляционного состава Т-цитотоксических клеток, выполненные методом проточной цитометрии, у пациентов с 1-м или 3-м генотипом ХВГС практически отсутствуют.

● **Таблица 3.** Субпопуляционный состав Т-цитотоксических клеток в крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С с 1-м и 3-м генотипами в зависимости от уровня вирусной нагрузки (%), Me ($C_{25}-C_{75}$)

● **Table 3.** Subpopulation composition of blood T-cytotoxic cells in patients with chronic viral hepatitis C with genotypes 1 and 3 depending on the level of viral load, Me ($C_{25}-C_{75}$)

Пациенты	Уровень вирусной нагрузки	Наивные Т-цитотоксические клетки CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁺	Т-цитотоксические клетки центральной памяти CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁺	Т-цитотоксические клетки эффекторной памяти CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁻	TEMRA Т-цитотоксические клетки CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁺ CD62L ⁻
С 1-м генотипом ХВГС (n = 74)	600–30 000 (n = 9)	3,34 (1,75–5,16)	5,88 (3,53–9,99)	6,95 (3,79–9,14)	6,78 (4,56–10,00)
	30 000–800 000 (n = 38)	3,99 (3,30–4,98)	5,76 (3,27–6,97)	9,98 (5,46–10,98)	9,01 (7,28–13,98)
	Более 800 000 (n = 27)	3,74 (2,59–4,67)	7,20 (4,44–9,28)	9,57 (5,77–12,02)	7,18 (5,02–10,81)
С 3-м генотипом ХВГС (n = 70)	600–30 000 (n = 7)	3,46 (3,03–8,23)	6,32 (4,98–10,91)	10,31 (2,69–13,98)	9,67 (7,65–14,54)
	30 000–800 000 (n = 32)	4,36 (2,27–5,65)	7,28 (4,35–10,47)	6,45 (3,72–10,87)	9,52 (6,04–12,19)
	Более 800 000 (n = 31)	4,44 (2,14–6,39)	9,35 (8,00–12,02)	6,50 (6,02–12,01)	9,88 (6,67–13,45)
Здоровые лица (n = 20)		2,20 (1,37–2,39)	9,68 (6,73–12,84)	6,72 (5,05–11,93)	6,68 (5,96–8,99)
P_{1-3}		0,78	0,29	0,13	0,43
P_{2-3}		0,87	0,24	0,89	0,08
P_{4-6}		0,38	0,04	0,04	0,84
P_{5-6}		0,83	0,18	>0,9	0,77
P_{1-7}		0,04	0,03	0,56	0,84
P_{2-7}		0,001	0,003	0,48	0,12
P_{3-7}		0,002	0,04	0,44	0,44
P_{4-7}		0,004	0,12	0,38	0,03
P_{5-7}		0,006	0,18	0,58	0,05
P_{6-7}		0,007	0,61	0,8	0,04
p_{1-2-3} (Краскела – Уоллиса)		0,5	0,18	0,05	0,21
p_{4-5-6} (Краскела – Уоллиса)		0,39	0,03	0,09	0,79

Примечание. Достоверность различий показателей между 2 группами рассчитана с использованием критерия Манна – Уитни, достоверность различий между несколькими группами – с помощью критерия Краскела – Уоллиса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты работы показали, что изменения субпопуляционного состава Т-цитотоксических клеток крови в большей степени ассоциированы с выраженностью фиброза печени у пациентов с 1-м и 3-м генотипами ХВГС. У пациентов с 3-м генотипом ХВГС регистрировалось выраженное снижение содержания TEMRA Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁻) и Т-цитотоксических клеток эффекторной памяти (CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺CD62L⁻) у больных

с фиброзом печени F3–F4 по METAVIR в сравнении с лицами с фиброзом печени F0–F1 по METAVIR (критерий Краскела – Уоллиса, соответственно $p = 0,02$ и $p = 0,04$). У лиц с 1-м генотипом ХВГС аналогичные процессы были выражены в меньшей степени. Мы надеемся, что полученные результаты будут полезны для совершенствования мероприятий по лечению и реабилитации больных ХВГС. 

Поступила / Received 16.03.2023

Поступила после рецензирования / Revised 03.04.2023

Принята в печать / Accepted 05.04.2023

Список литературы / References

- Kemming J, Thimme R, Neumann-Haefelin C. Adaptive Immune Response against Hepatitis C Virus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5644. <https://doi.org/10.3390/ijms21165644>.
- Spengler U, Nattermann J. Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clin Sci (Lond).* 2007;112(3):141–155. <https://doi.org/10.1042/CS20060171>.
- Stuart J.D., Salinas E., Grakoui A. Immune system control of hepatitis C virus infection. *Curr Opin Virol.* 2021;(46):36–44. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.10.002>.
- Hofmann M., Tauber C., Hensel N., Thimme R. CD8⁺ T Cell Responses during HCV Infection and HCC. *J Clin Med.* 2021;10(5):991. <https://doi.org/10.3390/jcm10050991>.

5. Thimme R. T cell immunity to hepatitis C virus: Lessons for a prophylactic vaccine. *J Hepatol.* 2021;74(1):220–229. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.022>.
6. Бацких С.Н., Морозов С.В., Чуланов В.П., Покровский В.И. Вирус гепатита С 3-го генотипа: такой «простой», такой «сложный». *Терапевтический архив.* 2012;84(11):4–10. Режим доступа: <https://ter-arkhiv.ru/0040-3660/article/view/31093>.
Batskikh S.N., Morozov S.V., Chulanov V.P., Pokrovskii V.I. Hepatitis C virus genotype 3: that «simple», yet that «complex». *Terapevticheskii Arkhiv.* 2012;84(11):4–10. (In Russ.) Available at: <https://ter-arkhiv.ru/0040-3660/article/view/31093>.
7. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J Hepatol.* 2017;66(1):153–194. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.001>.
8. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J Hepatol.* 2018;69(2):461–511. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026>.
9. Terminology of chronic hepatitis, hepatic allograft rejection, and nodular lesions of the liver: summary of recommendations developed by an international working party, supported by the World Congresses of Gastroenterology, Los Angeles, 1994. *Am J Gastroenterol.* 1994;89(8 Suppl):S177–S181. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8048409/>.
10. Poynard T., Bedossa P., Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIR, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIR groups. *Lancet.* 1997;349(9055):825–832. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)07642-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)07642-8).
11. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлуориметрического анализа. *Медицинская иммунология.* 2015;17(1):19–26. Режим доступа: <https://www.mimmun.ru/mimmun/article/viewFile/803/747>.
Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Medical Immunology (Russia).* 2015;17(1):19–26. (In Russ.) Available at: <https://www.mimmun.ru/mimmun/article/viewFile/803/747>.
12. Sutherland D.R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(4):637–651. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21626>.
13. Dustin L.B. Innate and Adaptive Immune Responses in Chronic HCV Infection. *Curr Drug Targets.* 2017;18(7):826–843. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825110532>.
14. Wherry E.J., Ha S.J., Kaech S.M., Haining W.N., Sarkar S., Katia V. et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity.* 2007;27(4):670–684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>.
15. Radziejewicz H., Ibegbu C.C., Hon H., Osborn M.K., Obideon K., Wehbi M. et al. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8+ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol.* 2008;82(20):9808–9822. <https://doi.org/10.1128/JVI.01075-08>.
16. Ha S.J., West E.E., Araki K., Smith K.A., Ahmed R. Manipulating both the inhibitory and stimulatory immune system towards the success of therapeutic vaccination against chronic viral infections. *Immunol Rev.* 2008;223:317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00638.x>.
17. Kasprovicz V., Schulze Zur Wiesch J., Kuntzen T., Nolan B.E., Longworth S., Berical A. et al. High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *J Virol.* 2008;82(6):3154–3160. <https://doi.org/10.1128/JVI.02474-07>.
18. Penna A., Pilli M., Zerbini A., Orlandini A., Mezzadri S., Sacchelli L. et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2007;45(3):588–601. <https://doi.org/10.1002/hep.21541>.
19. Khan O., Giles J.R., McDonald S., Manne S., Ngiew S.F., Patel K.P. et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature.* 2019;571(7764):211–218. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1325-x>.
20. Alfei F., Kanev K., Hofmann M., Wu M., Ghoneim H.E., Roelli P. et al. TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature.* 2019;571(7764):265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1326-9>.
21. Timm J., Lauer G.M., Kavanagh D.G., Sheridan I., Kim A.Y., Lucas M. et al. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med.* 2004;200(12):1593–1604. <https://doi.org/10.1084/jem.20041006>.
22. Calabrese F., Pontisso P., Pettenazzo E., Benvegnù L., Vario A., Chemello L. et al. Liver cell apoptosis in chronic hepatitis C correlates with histological but not biochemical activity or serum HCV-RNA levels. *Hepatology.* 2000;31(5):1153–1159. <https://doi.org/10.1053/he.2000.7123>.
23. Osuch S., Metzner K.J., Caraballo Cortés K. Reversal of T Cell Exhaustion in Chronic HCV Infection. *Viruses.* 2020;12(8):799. <https://doi.org/10.3390/v12080799>.
24. Shahnazarian V., Ramai D., Reddy M., Mohanty S. Hepatitis C virus genotype 3: clinical features, current and emerging viral inhibitors, future challenges. *Annals of Gastroenterology.* 2018;31(5):541–551. <https://doi.org/10.20524/aog.2018.0281>.
25. Bochud P.Y., Cai T., Overbeck K., Bochud M., Dufour J.F., Müllhaupt B. et al. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology.* 2009;51(4):655–666. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.016>.
26. Kanwal F., Kramer J.R., Ilyas J., Duan Z., El-Serag H.B. HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. *Hepatology.* 2014;60(1):98–105. <https://doi.org/10.1002/hep.27095>.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования – В.В. Цуканов

Написание текста – М.А. Черепнин, А.В. Васютин

Математическая обработка материала, формирование таблиц – М.А. Черепнин

Проверка критически важного содержания – В.В. Цуканов

Клиническое обследование пациентов – М.А. Черепнин, А.Г. Борисов

Методическое руководство лабораторными исследованиями и интерпретация результатов лабораторных исследований – А.А. Савченко

Методическое руководство инструментальными исследованиями и интерпретация результатов инструментальных исследований – Ю.Л. Тонких

Исследование крови методом проточной цитометрии – В.Д. Беленюк

Обзор литературы – А.В. Васютин

Перевод на английский язык – А.В. Васютин

Редактирование – В.В. Цуканов

Утверждение окончательного варианта статьи – В.В. Цуканов

Contribution of authors:

Study concept and design – Vladislav V. Tsukanov

Text development – Mikhail A. Cherepnin, Alexander V. Vasyutin

Mathematical processing of the material, the formation of tables – Mikhail A. Cherepnin

Verification of critical content – Vladislav V. Tsukanov

Clinical examination of patients – Mikhail A. Cherepnin, Alexander G. Borisov

Methodological guidance of laboratory research and interpretation of laboratory results – Andrei A. Savchenko

Methodological guidance of instrumental research and interpretation of instrumental results – Julia L. Tonkikh

Performing a blood test by flow cytometry – Vasilij D. Belenyuk

Literature review – Alexander V. Vasyutin

Translation into English – Alexander V. Vasyutin

Editing – Vladislav V. Tsukanov

Approval of the final version of the article – Vladislav V. Tsukanov

Информация об авторах:

Черепнин Михаил Александрович, младший научный сотрудник клинического отделения патологии пищеварительной системы у взрослых и детей, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3 «Г»; mikhail.cherepnin@yandex.ru

Цуканов Владислав Владимирович, д.м.н., профессор, заведующий клиническим отделением патологии пищеварительной системы у взрослых и детей, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3 «Г»; <https://orcid.org/0000-0002-9980-2294>; gastro@impn.ru

Савченко Андрей Анатольевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3 «Г»; <https://orcid.org/0000-0001-5829-672X>; aasavchenko@yandex.ru

Васютин Александр Викторович, к.м.н., старший научный сотрудник клинического отделения патологии пищеварительной системы у взрослых и детей, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3 «Г»; <https://orcid.org/0000-0002-6481-3196>; alexander@kraslan.ru

Борисов Александр Геннадьевич, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3 «Г»; <https://orcid.org/0000-0002-9026-2615>; 2410454@mail.ru

Беленюк Василий Дмитриевич, к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3 «Г»; <https://orcid.org/0000-0003-2848-0846>; dyh.88@mail.ru

Тонких Юлия Леонгардовна, к.м.н., ведущий научный сотрудник клинического отделения патологии пищеварительной системы взрослых и детей, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3 «Г»; <https://orcid.org/0000-0001-7518-1895>; tjulia@bk.ru

Information about the authors:

Mikhail A. Cherepnin, Junior Researcher of the Clinical Department of the Digestive System Pathology of Adults and Children, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Separate Subdivision "Scientific Research Institute of medical problems of the North"; 3G, Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, 660022, Russia; mikhail.cherepnin@yandex.ru

Vladislav V. Tsukanov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Clinical Department of the Digestive System Pathology of Adults and Children, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Separate Subdivision "Scientific Research Institute of medical problems of the North"; 3G, Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, 660022, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9980-2294>; gastro@impn.ru

Andrei A. Savchenko, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Separate Subdivision "Scientific Research Institute of medical problems of the North"; 3G, Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, 660022, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5829-672X>; aasavchenko@yandex.ru

Alexander V. Vasyutin, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher of the Clinical Department of the Digestive System Pathology of Adults and Children, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Separate Subdivision "Scientific Research Institute of medical problems of the North"; 3G, Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, 660022, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6481-3196>; alexander@kraslan.ru

Alexander G. Borisov, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Separate Subdivision "Scientific Research Institute of medical problems of the North"; 3G, Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, 660022, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9026-2615>; 2410454@mail.ru

Vasilij D. Belenyuk, Cand. Sci. (Med.), Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Separate Subdivision "Scientific Research Institute of medical problems of the North"; 3G, Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, 660022, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2848-0846>; dyh.88@mail.ru

Julia L. Tonkikh, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of the Clinical Department of the Digestive System Pathology of Adults and Children, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Separate Subdivision "Scientific Research Institute of medical problems of the North"; 3G, Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, 660022, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7518-1895>; tjulia@bk.ru