

На правах рукописи

Ходжибеков Расим Ринатович

**Патогенетическое и клиническое значение
плазмитоидных дендритных клеток при вирусном гепатите В**

14.01.09 – Инфекционные болезни

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Кожевникова Галина Михайловна**

Официальные оппоненты:

Волчкова Елена Васильевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет)» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Сундуков Александр Вадимович – доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им.А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «05» июля 2019 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 208.114.01 в ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (111123, Москва, ул. Новогиреевская, д.3а).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора и на сайте: www.crie.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Николаева Светлана Викторовна

Актуальность темы исследования

Вирусный гепатит В, несмотря на обширные кампании вакцинации и растущую осведомленность населения, по-прежнему является глобальной проблемой здравоохранения. Актуальность вирусного гепатита В сохраняется в связи с высокой заболеваемостью во многих странах острым гепатитом, который нередко бывает причиной развития хронического гепатита и источником инфицирования не иммунных лиц. Согласно оценкам ВОЗ ежегодно в мире регистрируется около 50 миллионов больных только с острой формой гепатита В, около 300 миллионов человек хронически инфицированы вирусом гепатита В. В России при значительном снижении числа случаев острого гепатита В заболеваемость хроническим гепатитом составляет до 12,6 случаев в год на 100 тыс. населения. Хронизация вирусного гепатита В может приводить к развитию цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Ежегодно от патологии, связанной с вирусом гепатита В, умирает в мире около 2 миллионов человек. [Шахгильдян И.В. и соавт., 2003; Абдурахманов Д.Т. 2012; Онищенко Г.Г. и соавт., 2016; Бюллетень ВОЗ, 2017].

Механизмы, с помощью которых вирус гепатита В устанавливает и поддерживает хроническую инфекцию, изучены недостаточно. Новым направлением в понимании механизмов иммунного ответа при вирусных гепатитах является открытие уникального типа иммунных клеток - плазмоцитоподобных дендритных клеток (pDCs), роль и значение которых, как возможных ключевых факторов патогенеза вирусных гепатитов, начали изучать лишь в последние годы [B.Reizis et al., 2013; Хохлова О.Н., 2015].

Плазмоцитоподобные дендритные клетки (pDCs) - клетки лимфоидного происхождения и морфологически напоминают плазматические клетки. Они играют важную роль в противовирусном иммунном ответе, так как обладают уникальной способностью распознавать вирусы посредством обнаружения вирусов и нуклеиновых кислот через Toll-подобные рецепторы. Особого внимания заслуживает процесс функционирования pDCs, в результате

которого эти иммунциты приобретают способность вырабатывать в 100-1000 раз больше интерферона I типа (ИФН), чем обычные клетки организма. pDCs являются активными участниками приобретённого иммунного ответа. Так, активация pDCs и их эффекторные функции, такие как секреция ИФН, могут приводить к лизису клеток-мишеней [Colonna M. et al, 2005; van Vliet SJ Ito T. et al, Lambotin M. et al, 2010]. Однако вопросы, касающиеся патогенетического и клинического значения pDCs при различных инфекциях, до настоящего времени остаются в значительной степени неизвестными.

Роль pDCs в иммунопатогенезе гепатита В является проблемой мало изученной, но обсуждаемой. Некоторые исследователи склоняются к тому, что вирус гепатита В не оказывает прямого влияния на pDCs, однако отмечено нарушение их функционирования у пациентов с хронической инфекцией [Duan X.Z. et al, 2005; Xu Y. et al, 2009].

Установление механизмов участия pDCs при инфекции вирусом гепатита В, а также поиск причины "ускользания" вируса гепатита В от иммунной системы и формирования хронической инфекции остаётся на сегодняшний день одним из важных и перспективных направлений научной деятельности. Более глубокое изучение роли pDCs в иммунопатогенезе гепатита В может пролить свет на актуальные вопросы формирования иммунного ответа организма на внедрение вируса и хронизацию данного заболевания, его исходов и возможностей терапии.

Степень разработанности темы исследования

Основанием для проведения настоящего диссертационного исследования явились научные результаты в области изучения иммунных механизмов в патогенезе вирусного гепатита В, значения различных факторов иммунитета в формировании хронического процесса, определения новых иммунных клеток и их функциональной активности при различных клинических проявлениях болезни. При большом научном интересе по изучаемой проблематике, в отечественной литературе практически отсутствуют сведения по изучению роли плазмацитоидных дендритных

клеток pDCs в иммунопатогенезе гепатита В, что обуславливает актуальность данной темы.

Цель исследования

Изучение патогенетического и клинического значения плазмоцитоидных дендритных клеток (pDCs) при вирусном гепатите В.

Задачи

1. Определить количественные показатели и функциональное состояние pDCs у больных, инфицированных вирусом гепатита В.
2. Изучить количественные показатели pDCs у больных гепатитом В в зависимости от течения инфекционного процесса.
3. Изучить функциональное состояние pDCs у больных гепатитом В в зависимости от течения и фазы инфекционного процесса.
4. Выявить особенности и дать сравнительную характеристику направленности изменений количества и функционального состояния pDCs у больных острым и хроническим гепатитом В.
5. Изучить показатели pDCs у больных острым гепатитом В в зависимости от исхода заболевания.

Научная новизна

Впервые в России проведено исследование по определению абсолютного и процентного числа клеток pDCs у больных острым и хроническим вирусным гепатитом В.

Впервые изучено функциональное состояние pDCs у больных вирусным гепатитом В в зависимости от формы болезни, клинико-лабораторных показателей.

Проведен сравнительный анализ данных количественных и функциональных характеристик в крови больных острым и хроническим гепатитом В для определения значения pDCs в формировании хронического течения болезни.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены новые сведения о состоянии pDCs у больных, страдающих гепатитом В, их соотношении со стадией инфекционного процесса, его активностью и течением.

Впервые дана оценка роли pDCs при вирусном гепатите В и сформулированы положения о их влиянии на течение заболевания.

Новые сведения о количестве и функциональном состоянии плазмоцитоидных дендритных клеток смогут служить дополнительным критерием оценки течения и прогнозирования исходов вирусного гепатита В.

Методология и методы исследования.

В исследование включено 63 человека с документированным диагнозом вирусного гепатита В, госпитализированных в Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы». Группа контроля составила 12 здоровых людей.

Методы исследования включали эпидемиологические, клинические, биохимические, серологические, иммунологические, молекулярно-биологические, инструментальные методы исследования.

Для статистической обработки полученных данных использованы программы Microsoft Office 2010; Statistica 10 и интернет сайт <http://medstatistic.ru/>. Для оценки статистической достоверности применялся метод оценки значимости различий средних величин – t-критерий Стьюдента. Для сравнения независимых выборок применялся U-критерий Манна-Уитни. Для проверки совокупностей данных использован критерий Колмогорова-Смирнова.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У больных вирусным гепатитом В происходит значительное снижение pDCs в абсолютном и процентном количестве клеток независимо от формы инфекционного процесса.

2. Выработка ИФН в pDCs достоверно выше у больных вирусным гепатитом В, чем у здоровых людей.

3. У больных с хроническими формами вирусного гепатита В отмечается достоверное снижение количества pDCs по сравнению с больными острой формой вирусного гепатита В и здоровыми лицами при высокой функциональной активности по выработке интерферона.

Степень достоверности и апробация исследования

Достоверность результатов исследования определялась обследованием 63 пациентов вирусным гепатитом В и 12 условно здоровых лиц с применением современных клиничко-лабораторных, иммунологических, инструментальных методов исследования и адекватной статистической обработкой данных с использованием современных программ.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на конференции European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (Amsterdam, Netherlands, 2016). Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» с участием сотрудников ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 20 марта 2019 года.

Внедрение в практику результатов исследования

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов" и при подготовке лекций для врачей-инфекционистов и врачей-терапевтов в системе непрерывного медицинского образования.

Результаты исследования внедрены в практику работы специализированного отдела по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии"

Роспотребнадзора при проведении научных исследований по проблемам хронических вирусных инфекций.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК РФ - 3, в зарубежных научных изданиях - 1.

Личный вклад автора

В рамках данной работы автором сформулированы цель и задачи исследования, проведен анализ данных научной литературы по теме диссертации, подбор и курация больных вирусным гепатитом В и здоровых людей, участвующих в исследовании, статистический анализ полученных данных. Автор совместно с сотрудниками иммунологической лаборатории специализированного отдела по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН “Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии” Роспотребнадзора осуществлял выделение дендритных клеток из моноцитов периферической крови с определением количественных показателей и их функциональной активности. Полученные результаты были проанализированы и обобщены автором.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора научной литературы, 7 глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов и заключения, итогов исследования и указателя литературы, содержащего 11 отечественных и 110 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 30 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика пациентов и методы исследования

Данная работа проводилась в период с 2015 г. по 2018 г. в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего

образования «Российский университет дружбы народов» на кафедре инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии.

В период проведения работы были обследованы 275 человек, поступившие на госпитализацию в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы» (главный врач к.м.н. Сметанина С.В.) с направительным диагнозом "Вирусный гепатит неясной этиологии".

Исследование проводилось в два этапа:

1 этап – оценка клинического состояния больных, госпитализированных с подозрением на наличие вирусного гепатита, включающая осмотр врача с анализом жалоб, данных эпиданамнеза, анамнеза заболевания, физикального осмотра, лабораторных методов обследования (клинический анализ крови, биохимический анализ крови), инструментальных методов исследования (УЗИ органов брюшной полости), обследование на наличие маркеров вирусных гепатитов А, В, С, Д, Е.

2 этап – после подтверждения диагноза вирусного гепатита В производился забор крови для подсчета абсолютного и процентного количества плазмоцитоидных дендритных клеток (pDCs) в СНИО ЭП СПИД ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора (руководитель – академик РАН, д.м.н., профессор В.В Покровский).

Критерии включения в исследование:

1. Документированный диагноз вирусного гепатита В;
2. Возраст старше 18;
3. Подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Вирусные гепатиты А, С, Е;
2. Наличие ВИЧ-инфекции;
3. Невозможность полностью понять содержание и смысл информированного согласия на участие в исследовании (в связи с

психическим расстройством, состоянием алкогольной или наркотической интоксикации, отказ больного от участия в исследовании или другими подобными состояниями, а также с недостаточным уровнем владения русским языком).

В ходе обследования у 63 пациентов на основании эпидемиологических, клинических и лабораторных данных был диагностирован вирусный гепатит В, у 213 пациентов были установлены вирусные гепатиты различной этиологии (А, Е, С) и другие причины поражения печени (механическая желтуха, алиментарный гепатит) при отсутствии HBsAg в крови.

Из 63 больных, включенных в исследование, у 28 человек диагностирован острый вирусный гепатит В (ОГВ), с хроническим гепатитом В (ХГВ) под наблюдением было 35 человек. Соотношение обследованных больных в сравниваемых группах позволило провести адекватный статистический анализ.

При изучении гендерных и возрастных характеристик установлено, что среди больных преобладали мужчины, причем 69% из них были моложе 40 лет. Больные ОГВ достоверно чаще были молодого возраста, тогда как среди больных ХГВ в возрастных группах до 40 лет и старше было одинаковое количество пациентов. По результатам клинико-лабораторного и инструментального обследования у 42,8% больных ХГВ (8 мужчин и 7 женщин) был выявлен цирроз печени различной степени декомпенсации (А, В, С по классификации Чайлд-Пью).

Динамическое наблюдение в период госпитализации и катамнез через 12 месяцев после выписки из стационара, комплексный анализ клинической симптоматики болезни, результатов лабораторных и инструментальных исследований позволили сделать заключение, что в исследование вошли пациенты с типичным течением острого и хронического гепатита В.

Контрольную группу составили 12 человек условно здоровых лиц без признаков патологии со стороны гепатобилиарной системы и с

отрицательными результатами анализов на наличие вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции.

Группа лиц, инфицированных вирусом гепатита В, и контрольная группа были сопоставимы по возрасту и гендерному составу.

Для решения поставленных задач были применены следующие методы: эпидемиологический, клинико-лабораторный, инструментальный, иммунологический, статистический.

Базовые методы исследования проводились в лаборатории ГБУЗ Инфекционной клинической больницы №1 Департамента здравоохранения города Москвы.

Диагноз моноинфекции вирусом гепатита В установлен на основании эпидемиологических данных, клинико-лабораторного обследования и подтвержден обнаружением в крови серологических маркеров методом ИФА. Определяли HBsAg; Anti-HBs; Anti-HBcOr IgM; Anti-HBcOr IgG (суммарный); HBeAg; анти-HBeAg; анти – HCV M, суммарные; анти – HAV Ig M, G; анти HEV Ig M; анти-HDV IgM; анти-HDV IgG.

При необходимости для уточнения диагноза, проведения дифференциальной диагностики с другими видами поражения гепатобилиарной системы проводились дополнительные методы обследования: УЗИ брюшной полости на аппарате Toshiba Ультразвуковой сканер Aplio MX Toshiba.

Для определения количества и функции плазмоцитоидных дендритных клеток (pDCs) в крови у больных вирусным гепатитом В, использовали специальные методы исследования.

Количественное определение pDCs проводилось методом проточной цитометрии на приборе EPICS XL (производство Beckman Coulter) с добавлением к образцам периферической крови специфических моноклональных антител: CD303 (BDCA-2).

Забор крови для подсчета относительного и абсолютного количества плазмоцитоидных дендритных клеток (pDCs) осуществлялся утром, натощак, путем венопункции.

Относительное и абсолютное количество pDCs определяли методом проточной цитометрии, на цитофлуориметре EPICS XL (Beckman Coulter) с добавлением моноклональных антител (MaT:CD303 антитела, человеческие, конъюгированные с флюоресцин-изоцианатом (FITC) CD123 антитела, мышьиные, конъюгированные с фикоэретрином (PE)(производства фирмы Miltenyi Biotec) и частиц FlowCount (Beckman Coulter) для абсолютного счета.

К 100 мкл цельной крови, предварительно аккуратно перемешанной, добавляли 10 мкл CD303 и 20 мкл CD123. Кровь тщательно перемешивали с MaT и инкубировали в течение 20 минут в темноте, при комнатной температуре. Затем к образцу добавляли 500 мкл лизирующего раствора Optilyze (Beckman Coulter), перемешивали и через 20-30 минут инкубации в темноте, при комнатной температуре, добавляли 500 мкл PBS, перемешивали и инкубировали еще 20 минут при тех же условиях. Перед анализом на проточном цитофлуориметре добавляли 100 мкл частиц FlowCount и тщательно перемешивали. Гейтирование осуществляли по двум каналам светорассеивания (forward scatter, side scatter). Сбор данных прекращали при 100 000 лимфоцитов в каждом образце.

Определение ИФН - продуцирующей функции pDC (выработка ИФН I типа) проводилось методом ИФА ELISA, с предшествующей стимуляцией ODN2216 и IL3.

Для получения супернатантов, образцы периферической крови больных ХГВ обрабатывались специфическими стимуляторами, такими как:

1. ODN2216 – синтетический олигонуклеотид, содержащий CpG ODN в определённых последовательностях, специфичный для распознавания TLR 9 и приводящий к сильному иммуностимулирующему эффекту - активации выработки интерферона в pDCs.

2. Интерлейкин 3 (IL3) – полипептидный цитокин, относящийся к группе гранулоцитарно-макрофагальных колониестимулирующих факторов, применяемый для стимуляции и дифференцировки клеточного роста наиболее ранних предшественников кроветворных клеток.

3. Далее образцы помещались в инкубатор ($t = +37^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2), где инкубировались течение 24 час, после чего отбирался клеточный супернатант и проба замораживалась при $t = -80^{\circ}\text{C}$. Определение выработки ИФН в супернатанте клеток проводили методом иммуноферментного анализа, с использованием наборов реагентов ИФА ELISA.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи статистической программы STATISTICA 10, интернет источника <http://www.medstatistic.ru>. Определены средняя величина (M) и ошибка средней величины (m), для сравнения количественных значений в контрольной и исследуемых группах в зависимости от характера распределения значений выборки использовали t- критерий Стьюдента и U- критерий Манна-Уитни, для проверки совокупностей данных использован критерий Колмогорова-Смирнова.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования было проведено сравнение количественных показателей pDCs в крови у больных вирусным гепатитом В с количественными показателями pDCs у здоровых людей.

При сравнении абсолютного и процентного числа клеток pDCs у больных вирусным гепатитом В и здоровых людей получили следующие результаты: у больных вирусным гепатитом было снижено абсолютное количество клеток и содержание pDCs в 100 тыс. лимфоцитов. Достоверность различий и в абсолютном и в процентном количестве клеток pDCs статистически значима (таблица 1).

Таблица 1 – Количественные показатели pDCs у больных вирусным гепатитом В и здоровых людей

pDCs	Больные ВГВ n=63	Здоровые n=12	Коэффициент достоверности различий (p)
Абсолютное количество клеток (кл\мкл)	6,25±0,561	10,25±1,752	p1-2=0,03
Процентное количество клеток (%)	0,14±0,011	0,27±0,052	p1-2=0,01

Для понимания роли pDCs крови в иммунопатогенезе вирусного гепатита В и определении значения количества этих клеток в остром периоде болезни и при формировании хронического течения были изучены количественные характеристики pDCs у пациентов острым гепатитом В и хроническим гепатитом.

При проведении сравнения показателей pDCs у больных ОГВ и в контрольной группе установлено, что у больных абсолютное количество клеток составляет 7,25±1,2 кл/мкл, в контрольной группе - 10,25±1,75 кл/мкл, достоверность различий статистически не значима (p>0,05). Тогда как при сравнении процентного количества клеток получено достоверное снижение этого показателя у больных (0,13±0,02%) по сравнению со здоровыми людьми (0,27±0,52%).

Проанализирована взаимосвязь возраста и количественные показатели pDCs у больных ОГВ в возрастных группах от 18 до 40 лет и старше 40 лет. Не установлено статистически значимой разницы показателей в разных возрастных группах.

При сравнении абсолютного количества клеток pDCs у больных, страдающих ХГВ, и здоровых людей установлено, что показатели здорового человека (10,25±1,75 кл/мкл) более, чем в 2 раза выше показателей больных

ХГВ ($4,6 \pm 0,65$ кл/мкл), различие между ними статистически значимо ($p < 0,05$).

При сравнении процентного количества клеток показано, что различие между процентным количеством клеток у больных ХГВ и здоровыми людьми также статистически значимо (таблица 2).

Таблица 2 – Абсолютное и процентное количество клеток pDCs у больных при хронической форме вирусного гепатита В

pDCs	ХГВ n=35	Здоровые n=12	Коэффициент достоверности различий (p)
Абсолютное количество клеток (кл\мкл)	$4,6 \pm 0,65^2$	$10,25 \pm 1,75^2$	$P^{1-2} = 0,004$
Процентное количество клеток (%)	$0,12 \pm 0,02^2$	$0,27 \pm 0,05^2$	$P^{1-2} = 0,01$

Были определены количественные показатели pDCs крови у больных ХГВ в разных гендерных группах. В ходе обследования было выявлено, что как абсолютное количество pDCs в крови, так и на процентное количество клеток статистически не отличается у мужчин и женщин.

В результате сравнения количественных показателей pDCs у больных ХГВ разных возрастных групп мы выяснили, что возраст не оказывает существенного влияния как на абсолютное, так и на процентное количество клеток pDCs. У людей от 18 до 40 лет и у людей старше 40 лет количество клеток pDCs существенно не отличалось (соответственно $3,3 \pm 0,83$ и $3,4 \pm 0,7$), а достоверность различий между ними статистически не значима.

В соответствии с задачами исследования был проведен сравнительный анализ количественных показателей pDCs крови у больных с острой и

хронической формами вирусного гепатита В, результаты которого представлены в таблице 3.

У больных острой формой гепатита В абсолютные показатели рDCs превысили показатели рDCs больных хронической формой почти в 1,5 раза. При сравнении процентного количества клеток рDCs на 100 тыс. лимфоцитов в группах ОГВ и ХГВ статистически значимой разницы не получено.

Таблица 3 – Абсолютное и процентное количество клеток рDCs при острой и хронической формах вирусного гепатита В

рDCs	Больные вирусным гепатитом В		Коэффициент достоверности различий (р)
	ОГВ n=28	ХГВ n=35	
Абсолютное количество клеток (кл\мкл)	7,25±1,2 ¹	4,6±0,65 ²	Р ¹⁻² =0,06
Процентное количество клеток(%)	0,13±0,02 ¹	0,12±0,02 ²	Р ¹⁻² =0,8

Наши данные согласуются с результатами работы Jeremie Martinet, Tania Dufeu-Duchesne at al, в которой был проведен анализ количественных показателей рDCs у 180 пациентов хроническим вирусным гепатитом В. Авторы полагают, что ХГВ избегает антивирусного иммунитета, изменяя функции рDCs путем нарушения взаимодействия между рDCs и НК-клетками. По аналогии с нашим исследованием пол и возраст не оказывал влияния на количественные показатели рDCs.

Были проанализированы количественные характеристики рDCs у больных вирусным гепатитом В при различных уровнях активности трансаминаз. В нашем исследовании пациенты были распределены в три

группы в зависимости от уровня активности АлТ: N (до 40 ед/л), до 3 N (от 40 ед/л до 120-150 ед/л), более 3 N (более 150 ед/л).

Анализируя связь между количественными показателями клеток pDCs и степенью цитолиза, удалось установить, что у больных при нормальных уровнях трансаминаз отмечалось снижение показателей числа клеток pDCs $5 \pm 1,2$ кл/мкл против $10,25 \pm 1,75$ кл/мкл здоровых людей, а у больных с вирусным гепатитом В при уровне АлТ более 3 N они составляли $-7,3 \pm 0,93$ кл/мкл против $4,9 \pm 0,6$ кл/мкл, что в 1,5 раза превышает абсолютное количество клеток pDCs у больных с уровнем АлТ до 3 N. Полученные данные не позволяют утверждать, что существует прямая взаимосвязь между количественными характеристиками pDCs крови больных ВГ и активностью АлТ.

Для патогенеза гепатита В важное значение имеет интерферогенез. В связи с этим была поставлена задача определения выработки интерферона pDCs у больных различными формами гепатита В.

Функциональное состояние pDCs (выработка ИФН) у условно здоровых лиц в 100% случаев не определялось и было ниже уровня детекции применяемого для этой цели высокочувствительного метода (нижняя граница определения ИФН - 3 пг/мкл).

У всех обследованных больных вирусным гепатитом выработка ИФН pDCs достоверно выше показателей условно здоровых лиц.

При анализе соотношения выработки ИФН в pDCs при острой и хронической формах вирусного гепатита В были получены следующие данные: выработка ИФН в pDCs не различалась между группами больных с ОГВ и ХГВ и составила у больных ОГВ - $9,5 \pm 1,7$ пг/мл, у больных ХГВ $8,3 \pm 1,9$ пг/мл (таблица 4).

При изучении взаимосвязи функционального состояния pDCs у больных вирусным гепатитом В и пола установлено, что у мужчин выработка ИФН в pDCs составила $9,01 \pm 1,26$ пг/мл и не отличалась от функционального pDCs у женщин - $8,35 \pm 1,88$ пг/мкл.

Таблица 4 – Количественные показатели выработки ИФН при острой и хронической формах вирусного гепатита В

pDCs	Больные вирусным гепатитом В		Коэффициент достоверности различий, p
	ОГВ n=28	ХГВ n=35	
Выработка ИФН пг\мл	9,5±1,7	8,3±1,9	p=0,6

В результате изучения функционального состояния pDCs установлено, что интерферогенез не имел значимых различий у группы больных ОГВ и ХГВ, оставаясь выше показателей у условно здоровых лиц.

Проведено проспективное исследование наблюдаемых пациентов через 12 месяцев после выписки из стационара.

Установлено, что из 28 больных, находившихся в стационаре с диагнозом острого гепатита В, у 19 (67,9 %) человек HBsAg не определялся на протяжении 6 месяцев после клинического выздоровления, у 9 человек клиничко-лабораторные данные свидетельствовали о формировании хронического гепатита В (32,1%).

Данный раздел диссертационной работы выполнялся ретроспективно на основании исходных показателей pDCs у больных гепатитом В, наблюдаемых в остром периоде болезни.

У пациентов с полным клиничко-лабораторным выздоровлением при обследовании абсолютное количество клеток составило $8,3 \pm 1,5$ кл/мкл, что почти в 2 раза превышало абсолютное количество клеток у пациентов с формированием хронической формы гепатита В ($4,0 \pm 0,85$ кл/мкл). Достоверность различий между показателями статистически значима. Следовательно, можно предположить, что высокое количество pDCs в остром периоде болезни является благоприятным прогностическим признаком и сопровождается элиминацией вируса.

Выработка ИНФ у больных с исходом в хроническую форму гепатита В составила $6 \pm 2,1$ п/мл, а у пациентов с полным выздоровлением $9,3 \pm 2,03$, но достоверность различий между этими двумя показателями статистически не является значимой.

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что количество и функциональная активность плазмоцитоидных дендритных клеток играют важную роль в комплексе иммунных реакций при инфицировании вирусом гепатита В и в механизмах формирования хронического инфекционного процесса.

ИТОГИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. У всех больных вирусным гепатитом В отмечается значительное снижение количественных показателей рDCs (абсолютного и процентного количества) по сравнению с условно здоровыми людьми. Функциональная активность по выработке интерферона рDCs достоверно выше у больных вирусным гепатитом В, чем у условно здоровых лиц.

2. Количественные показатели рDCs при остром гепатите В достоверно выше чем при хроническом гепатите В. Выработка интерферона у больных острой формой вирусного гепатита В составила $9,5 \pm 1,7$ пг/мл, что достоверно выше чем у условно здоровых лиц.

3. У больных хроническим гепатитом В абсолютное и процентное содержание рDCs в крови достоверно ниже, чем у условно здоровых лиц, при этом функциональная активность в рDCs достоверно выше, чем тот же показатель у здоровых лиц.

4. У больных с хроническими формами вирусного гепатита В отмечается достоверное снижение количества рDCs по отношению к больным с острой формой вирусного гепатита В. При этом функциональная активность рDCs у инфицированных вирусным гепатитом В выше по сравнению с условно здоровыми лицами.

5. Количественные показатели pDCs при острой форме вирусного гепатита В превысили показатели pDCs при хронической форме вирусного гепатита В в 1,5 раза, что является статистически значимым. При анализе соотношений количественных показателей pDCs по выработке интерферона при острой и хронических формах достоверных различий не установлено.

6. У больных острым вирусным гепатитом В с исходом в хронический гепатит количественные показатели pDCs достоверно ниже, чем у лиц с клинико-лабораторным выздоровлением.

Практические рекомендации

1. Определение количественных и функциональных показателей pDCs крови может быть рекомендовано при обследовании больных острым вирусным гепатитом В, как одного из прогностических факторов развития хронического гепатита.

2. Рекомендовать использовать количественные и функциональные характеристики плазматоидных дендритных клеток в научных исследованиях по проблемам хронических вирусных инфекций.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Учитывая значение иммунных реакций в патогенезе вирусного гепатита В, теоретический и практический интерес представляют изучение роли pDCs в иммунопатогенезе гепатита В. Исследования количественных и функциональных показателей pDCs у больных гепатитом В при разных сроках инфицирования, в зависимости от степени поражения печени и от методов лечения, позволят объяснить механизмы иммунного ответа организма на внедрение вируса гепатита В, на течение и исходы болезни. Изучения по данной проблематике следует провести на большей по численности когорте больных.

Список печатных работ по теме диссертации.

1. Хохлова О.Н., Серебровская Л.В., Ходжибеков Р.Р., Гезахегне Д.Б., Кожевникова Г.М., Покровский В.В., Рейзис А.Р. Роль плазмоцитоидных дендритных клеток как новых иммуноцитов в патогенезе ХГС, ХГВ и ВИЧ-инфекции. *Инфекционные болезни*. 2016. Т. 14. № 4. С. 31-36.
2. Rasim R. Khodzhibekov, O.N.Khokhlova, L.V.Serebrovskaya, U.A.Kuimova, A.V.Pokrovskaya, G.M.Kozhevnikova. Comparison of plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV monoinfection and in combination with HBV. *ESCMID 2016, Amsterdam* p.106 - 107.
3. Хохлова О.Н., Серебровская Л.В., Герасимова Н.В., Ходжибеков Р.Р., Гезахенге Д.Б., Кожевникова Г.М., Рейзис А.Р. Иммунный статус больных ВИЧ-инфекцией и ее сочетанием с гепатитами С и В с позиции состояния плазмоцитоидных дендритных клеток. *Инфекционные болезни*. 2017. Т. 15. № S1. С. 301-302.
4. Ходжибеков Р.Р., Серебровская Л.В., Хохлова О.Н., Кожевникова Г.М., Рейзис А.Р. Изменение функциональной активности и количества плазмоцитоидных дендритных клеток у больных различными формами гепатита В. В книге: *Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы* Материалы X Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием. 2018. С. 240.
5. Ходжибеков Р.Р. Хохлова О.Н. Кожевникова Г.М. Рейзис А.Р. Плазмоцитоидные дендритные клетки и их роль в иммунопатогенезе вирусных инфекций на примере гепатита В. *Журнал инфектологии*. 2019 №2. 21-25.