

СЕМЕНОВ  
Александр Владимирович

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ  
ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТАХ

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика  
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научные консультанты:**

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор **Тотолян Арег Артемович**;  
доктор медицинских наук, профессор **Козлов Антон Владимирович**.

**Официальные оппоненты:**

**Черешнев Валерий Александрович**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, директор;

**Михайлов Михаил Иванович**, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова" ФАНО России, заведующий лабораторией вирусных гепатитов;

**Бобкова Марина Ридовна**, доктор биологических наук, ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующего отделом Института вирусологии им. Д.И. Ивановского.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «30» ноября 2017 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте: <http://www.arcerm.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования.**

Лабораторная диагностика повреждений печени при хронических вирусных гепатитах – сложный комплекс из десятков разнообразных тестов, начиная от инструментально-аппаратных, биохимических, серологических, иммунологических, заканчивая самыми сложными молекулярно-биологическими исследованиями. Диагностические тесты, оценивающие способность печени к нормальному функционированию, выполняются в лабораториях самого разного уровня оснащенности, являясь одним из наиболее массовых видов лабораторных исследований.

Среди существующих групп гепатотропных агентов, повреждающих печеночную ткань, особое место занимают возбудители вирусных гепатитов, в т. ч. хронических вирусных гепатитов В, С и D. Всемирная организация здравоохранения насчитывает в мире более 400 млн. хронических носителей вируса гепатита В (ГВ) и около 150-200 млн. носителей вируса гепатита С (ГС) (<http://www.who.int/topics/hepatitis/factsheets/en/>). По самым осторожным оценкам ВОЗ, ежегодно хронические вирусные гепатиты вызывают около 1 млн. смертей (Lozano R. et al., 2012).

Распространенность хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации представляет серьезную проблему для системы здравоохранения, включая лабораторную службу, поскольку по состоянию на 31.12.2015 г было официально зарегистрировано 811534 больных хроническими вирусными гепатитами, что составляет 0,56% от численности населения (Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор., 2016). Вследствие чего велико и число исследований, выполняемых в клиничко-диагностических лабораториях, как для выявления нарушения функций печени, так и для установления этиологии заболевания, вызывающих подобные нарушения.

Основная часть данного исследования посвящена специфическим лабораторным маркерам повреждения печени, вызванного вирусами гепатита В и С. Актуальность изучения проблем лабораторной диагностики хронических вирусных гепатитов несомненна, поскольку остается много вопросов относительно трактовки тех или иных результатов лабораторных исследований. Необходимо введение новых лабораторных маркеров, связанных с иммунопатогенезом заболевания, переоценка трактовки результатов лабораторного обследования хорошо известных, общепризнанных маркеров, таких как HBsAg, модификация алгоритмов интерпретации результатов лабораторных исследований в связи с внедрением новых технологий в лабораторную практику.

В качестве примера для иллюстрации вышесказанного можно привести иммуноферментный тест для количественного определения HBsAg в периферической крови пациентов с ХВГВ. Впервые данная методика появилась в середине 90-х годов XX века (Le Guillou D. V. et al., 2000), но клинического применения анализ не нашел, замененный значительно более дорогим, но более чувствительным и специфичным определением количества ДНК ВГВ методом ПЦР как для прогноза течения заболевания, так и для лабораторного сопровождения противовирусной терапии (Berger A. et al., 2001). Только спустя полтора десятилетия, после замены иммуноферментной технологии, гораздо более чувствительной и специфичной технологией хемилюминесцентного анализа, количественное определение HBsAg нашло свое применение. Этот, казалось бы, отвергнутый ранее лабораторный маркер на ином технологическом уровне используется для прогноза течения ХВГВ (Hadziyannis E. et al., 2014), мониторинга эффективности противовирусной терапии, причем как гораздо более информативный, чувствительный и экономически эффективный показатель, чем количественное определение ДНК ВГВ в периферической крови (Chen C. H. et al., 2014; Martinot-Peignoux M. et al., 2015).

Накопление знаний о механизмах репликации вируса, особенностях его взаимодействия с иммунной системой человеческого организма, путях реализации как продуктивного иммунного ответа, так и о возможностях иммунной эвазии (т.е. избегания, что приводит к длительной персистенции возбудителя в организме) позволяет расширить спектр применяемых лабораторных маркеров диагностики повреждения печени. Например, осознание ведущей роли цитокинов в

регуляции иммунного ответа (Wasmuth H. et al., 2010) позволило по-иному взглянуть на возможность их использования в качестве индикаторов воспаления печеночной ткани, в том числе при определении стадии фиброза печени (Семенов А. В. и др., 2015; Brass A. et al., 2014), и даже разработать соответствующий диагностический алгоритм.

### **Степень разработанности проблемы**

Сравнительно недавно установлено, что в процессах повреждения ткани печени ведущая роль принадлежит не цитопатическому действию вирусов гепатита В или С, а реализации иммунного ответа. При ингибировании вирусом врожденного иммунного ответа не развивается эффективный адаптивный иммунный ответ, что способствует переходу ОГ в ХГ. Показано, что, под воздействием белков ВГВ, например НВeAg, значительно снижается экспрессия TLR2 на гепатоцитах, Купферовских клетках и моноцитах периферической крови у пациентов с ХВГВ (Visvanathan K. et al., 2007). Соответственно нарушается выработка провоспалительных цитокинов, привлекающих иммунокомпетентные клетки в очаг воспаления (TNF $\alpha$ , различные интерлейкины IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12) (Dunn C. et al., 2007). Т.е. клетки иммунной системы могут быть использованы для оценки активности процесса воспаления печеночной ткани и адекватности иммунного ответа при ХГВ.

В адаптивном клеточном иммунном ответе на инфекцию ВГВ, ключевую роль играют как CD8+ Т-клетки, так и CD4+ Т-клетки (Rehermann V. et al., 1995). Для больных ХВГВ характерен незавершенный Т-клеточный ответ против антигенов ВГВ, что приводит к хронизации заболевания (Zampino R. et al., 2015). Подобное угнетение Т-клеточного ответа характерно и для ХВГС (Kurktschiev P. et al., 2014).

Доказана корреляция между тяжестью воспалительного процесса в печени, прогрессом фиброза, исходом противовирусной терапии и уровнем экспрессии лигандов хемокиновых рецепторов CCR5 (CCL5/RANTES; CCL4/MIP-1 $\alpha$ ) и CXCR3 (CXCL10/IP10; CXCL9/MIG; CXCL11/ITAC) (Wald I. et al., 2007; Zeremski M. et al., 2008). Установлена связь между содержанием в периферической крови CXCL10/IP10 и снижением вероятности получения стойкого противовирусного ответа при применении стандартной терапии ХГС ПЕГ-ИФН и рибавирином (Diago M. et al., 2008).

При относительной легкости проведения ПБТ ВГС современными противовирусными препаратами, предпочтение следует отдавать пациентам с активным воспалительным процессом в ткани печени. Поэтому особое значение приобретают методы оценки повреждения ткани печени при ХВГС, а также поиск новых маркеров фиброзирования (Schwabe R. F. et al., 2001). Изучение экспрессии генов и процесса секреции лигандов хемокинового рецептора CXCR3 показало их роль в активации звездчатых клеток и синтеза ими избытка коллагена с замещением ткани печени (Жданов К. В. и др., 2007; Zeremski M. et al., 2009).

Повышенный интерес к ОкГВ вызван тем, что начиная с 70-х гг. прошлого века было убедительно продемонстрировано, что стандартный скрининг инфекции ВГВ по НВsAg не гарантирует отсутствия инфекционного процесса в ткани печени. Перспективным биомаркером для лабораторной диагностики ОкГВ может быть оценка эпигенетических факторов, участвующих в регулировании функциональной активности ккзДНК ВГВ и гистоновыми белками, связанными с этой минихромосомой. Работами Pollicino T. с соавт. (2006), доказана ведущая роль ацетилирования/деацетилирования H3/H4 гистоновых белков в регулировании репликации ВГВ.

Показано подавление иммунного ответа при инфицировании ВГД за счет ингибирования цитокинового и хемокинового каскада, запускаемого IFN $\alpha$ , что приводит к неадекватному развитию цитокинового ответа (Löseke S. et al., 2006; Pugnale P. et al., 2009). Это может быть одной из причин хронизации ВГД и трудностей с противовирусной терапией при ХГВ+D. Ингибирование продукции IFN $\alpha$  и блокирование внутриклеточного сигнала от IFN-связывающих рецепторов позволяет вирусу продолжить репликацию, угнетая ответ иммунной системы (Hartwig D. et al., 2016).

Таким образом, несмотря на огромный багаж знаний о маркерах повреждений ткани печени при хронических вирусных гепатитах, накопленный в предыдущие десятилетия, все время

появляются новые факты и данные, свидетельствующие о том, что эта область клинической лабораторной диагностики бурно развивается и движется вперед стремительными темпами.

### **Цель исследования**

Выявить значимость и информативность молекулярно-биологических и иммунологических маркеров повреждения ткани печени, ассоциированного с хроническими вирусными гепатитами В, В+D и С, для оценки степени фиброза печени и прогноза течения заболевания.

### **Задачи исследования**

1. Показать значимость глубокого субтипирования РНК ВГС и ДНК ВГВ с помощью анализа первичной нуклеотидной последовательности для выявления редко встречающихся на территории Российской Федерации геновариантов ВГС и ВГВ.
2. Исследовать молекулярно-генетическую структуру ВГВ и спектр циркулирующих на территории Российской Федерации и некоторых стран СНГ субгенотипов при оккультной форме течения ГВ с помощью анализа первичной нуклеотидной последовательности ДНК ВГВ.
3. Определить информативность количественного определения ккзДНК ВГВ в ткани печени и концентрации HBsAg в сыворотке периферической крови как биомаркера повреждения ткани печени при различных вариантах активности течения ХВГВ, в том числе при моно- и коинфекции ХВГВ+D и ХВГВ+С.
4. Определить целесообразность выявления РНК ВГD методом ПЦР у пациентов с активным течением ХВГВ как маркера серонегативного ХВГВ+D, в том числе при ко- и суперинфекции.
5. Выявить значимость определения малых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, а также концентрации в плазме периферической крови и уровня экспрессии мРНК СС-хемокинов в ткани печени для оценки стадии фиброза печени при ХВГС.

### **Научная новизна и теоретическая значимость**

Проведенное исследование позволило обосновать необходимость внедрения новых молекулярно-биологических маркеров, в том числе с применением используемых технологий лабораторного анализа, для диагностики вирусных гепатитов, а также расширило представление об иммунопатогенезе поражения ткани печени и развитии фиброза/цирроза при хронических вирусных гепатитах В и С.

Применение метода прямого секвенирования нуклеотидной последовательности позволило получить новые данные о молекулярно-биологической характеристике вирусов гепатита В, С и D, циркулирующих на территории РФ и некоторых сопредельных стран. Впервые на территории РФ выявлен изолят ВГС субтипа 3g.

Разработан метод выявления ккзДНК ВГВ в плазме периферической крови с помощью двухступенчатой ПЦР перекрывающихся фрагментов генома ВГВ для выявления малых количеств ДНК ВГВ.

Впервые в РФ с помощью выявления ккзДНК ВГВ в ткани печени показана широкая распространенность оккультного гепатита В у пациентов при серонегативном криптогенном гепатите.

Впервые в РФ с помощью количественного определения ккзДНК ВГВ в ткани печени показано различие репликативной активности между больными с истинным ХВГВ, неактивными носителями HBsAg, пациентами с моно- и ко-инфекцией.

Установлена частота встречаемости РНК ВГD среди HDg-серонегативных больных ХВГВ.

Впервые проведена комплексная оценка хемокинов и хемокиновых рецепторов в крови и ткани печени у больных ХВГС с учетом особенностей клинических и вирусологических параметров, что позволило выявить корреляцию между стадиями фиброза печени и уровнем хемокинов и субпопуляций лимфоцитов, что позволило разработать неинвазивный метод определения стадий заболевания.

Впервые определены количества основных субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 в периферической крови больных ХВГС, и выявлена корреляция со слабой, умеренной, тяжелой степенями фиброза и циррозом печени, что позволило

на основании дифференциально-диагностических иммунологических признаков проводить мониторинг и прогнозировать течение ХВГС у больных с различными степенями фиброза печени.

Определены оригинальные первичные нуклеотидные последовательности ДНК ВГВ из 97 изолятов, РНК ВГС из 60 изолятов и РНК ВГD из 30 изолятов, циркулирующие на территории РФ и государств СНГ.

На территории РФ выявлена циркуляция редких субгенотипов ВГС, не выявляемых генотипической ПЦР.

Показана генетическая однородность ВГВ у пациентов с оккультным и манифестными вариантами течения заболевания, а спектр выявленных субтипов вируса характерен для каждого конкретного географического региона.

Концентрация ккзДНК ВГВ в ткани печени отражает активность течения ХВГВ, вызванного вирусом ГВ генотипа D; получена новая информация о встречаемости разных субгенотипов генотипа D ВГВ в разных географических регионах.

Показана возможность существования серонегативного варианта течения ХВГD у пациентов с активным течением ХВГВ.

Развитие воспалительного процесса в ткани печени при ХВГС сопровождается нарастанием экспрессии мРНК провоспалительных хемокинов в печени, что приводит к увеличению концентрации лигандов CXCR3-рецептора в периферической крови.

#### **Практическая значимость**

Разработаны критерии дифференциальной диагностики стадий фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С на основе патента на изобретение «Способ лабораторной диагностики стадии фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С» (№2015103011 от 29.01.2015), что позволило разработать алгоритм малоинвазивной диагностики фиброза печени способный дифференцировать с высокой чувствительностью и специфичностью стадии фибротического процесса при ХВГС.

Разработан способ выявления ДНК ВГВ при оккультной форме ХГВ на основе заявки на изобретение «Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР» (№2016144898/15(072041) от 15.11.2016), что позволило выявлять репликацию вируса ГВ у пациентов с ОкГВ с низкой вирусной нагрузкой.

Разработанный способ количественного определения ккзДНК ВГВ в ткани печени позволяет определить активность течения ХВГВ с использованием этого биомаркера.

Зарегистрированные для клинической лабораторной диагностики ПЦР тест-системы для выявления РНК ВГD позволили выявить широкую распространенность серонегативной формы ХВГD среди пациентов с активным течением ХВГВ.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Глубокое субтипирование РНК ВГС и ДНК ВГВ с помощью анализа первичной нуклеотидной последовательности позволяет определить редкие для РФ субтипы указанных вирусов, а также выявить спектр геновариантов ВГВ как при манифестной, так и оккультной формах ХВГВ.
2. Определение ккзДНК ВГВ в ткани печени позволяет достоверно выявить оккультный ГВ у пациентов с HBsAg-негативным гепатитом, отражая активность ХВГВ как при моно-, так и при коинфекции.
3. Определение РНК ВГD у пациентов с активным течением ХВГВ позволяет выявить серонегативный вариант течения гепатита D, в том числе во всех случаях ко- и суперинфекции ВГВ+D.
4. Определение малоинвазивным высокоинформативным методом мультиплексного анализа концентрации хемокинов в плазме периферической крови с использованием разработанного алгоритма позволяет установить стадию фиброза печени при ХВГС.
5. Динамика абсолютного и относительного содержания малых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR6 и CXCR3, в периферической крови отражает изменение активности воспалительного процесса при ХВГС.

### **Реализация и внедрение результатов исследования**

Результаты настоящего исследования включены в национальное руководство «Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство; в 2 т.», под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова, 2012 г. в качестве отдельной главы «Вирусологические исследования. Молекулярно-биологические методы», в методическое пособие «Молекулярная эпидемиология вирусных гепатитов: пособие для врачей» под ред. Мукомолова С. Л., 2014 г., аналитический обзор «Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. Том 10» под ред. под ред. В. И. Покровского, А. А. Тотоляна., 2016 г.

Разработанные критерии дифференциальной диагностики стадий фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С защищены патентом на изобретение «Способ лабораторной диагностики стадии фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С» (№2015103011 от 29.01.2015).

Подана заявка на изобретение «Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР» (№2016144898/15(072041) от 15.11.2016).

Результаты настоящего исследования используются в практических занятиях и лекциях «Хронические вирусные гепатиты», «Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний», проводимых на кафедре клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» МЗ РФ, на кафедре инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии в ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» МЗ РФ и в учебном процессе кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ.

Определенные в исследовании первичные нуклеотидные последовательности ДНК 97 изолятов ВГВ, РНК 60 изолятов ВГС и 30 изолятов ВГД депонированы в международную базу данных GenBank.

### **Возможные области применения и формы внедрения**

Клиническая лабораторная диагностика, инфектология, клиническая иммунология, молекулярная эпидемиология. Экономический эффект от внедрения результатов настоящего исследования будет определяться повышением эффективности определения степени повреждения ткани печени при хронических вирусных гепатитах, рациональном обосновании назначения этиотропной противовирусной терапии, повышением эффективности лечения и снижением частоты неблагоприятных последствий поражения ткани печени.

### **Методология и методы исследования**

Для выполнения цели исследования, реализации поставленных задач исследования и обоснования основных положений были использованы теоретический анализ литературы, современные лабораторные методы исследования, методы статистической и биоинформатической обработки данных.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов обеспечена теоретическим анализом проблемы, репрезентативным объемом выборок обследованных пациентов, достаточным количеством выполненных наблюдений с использованием современных лабораторных методов и адекватным статистическим анализом данных.

Основные положения работы, а также содержание ее отдельных этапов были представлены на: VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (2014); Научно-практической конференции «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» (2014); Юбилейной научно-практической конференции «Современные проблемы иммунофармакологии, биотехнологии и цитокиновой регуляции», посвящённой 40-летию ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России (2014); Institute Pasteur International Network. Paving the way for Research on Global Health and One Health (2014); XV Всероссийском Научном Форуме с

международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2015); Международной конференции «Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней» (2015); International scientific symposium Institute Pasteur international network (2015); XX Всероссийской юбилейной научно-практической конференции «Достижения и перспективы лабораторной службы России» (2015 г.); XXII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (2015); Российском конгрессе лабораторной медицины (2015); VI Международном Съезде Инфекционистов Узбекистана (2015); V конференции по вопросам ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии (2016); Региональной научно-практической конференции «Эпидемиология ВИЧ и хронических вирусных гепатитов» (2016); Научно-практической конференции «Лабораторная диагностика: менеджмент и технологии» (2016); International scientific symposium Institute Pasteur international network (2016); XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (2017); IX Ежегодном всероссийском конгрессе по инфекционным болезням (2017); The International Liver Congress 2017 – 52nd annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (2017).

По теме диссертации опубликовано 23 статьи, в том числе 22 статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях, 1 глава в национальном руководстве, 1 методическое пособие для врачей и 1 аналитический обзор.

#### **Личное участие автора**

Диссертант лично участвовал в планировании и организации настоящего исследования, отборе биологического материала, проведении лабораторных экспериментов, обработке, анализе, обобщении и представлении полученных данных.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 262 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 20 таблицами. Список литературы включает 422 источника, из них 17 – отечественных авторов и 405 – зарубежных.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

Настоящее исследование выполнено в 2010-2016 гг. в лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции и лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии «Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» и в лаборатории кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России. На проведение данного исследования было получено согласие Локального этического комитета ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России.

#### *Клинический материал*

Материалом исследования служила кровь и/или пункционные биоптаты печени, биообразцы для исследований получены от 2152 человек (Таблица 1). Для обследования на серологические маркеры вирусных гепатитов методом ИФА использовалась сыворотка крови пациентов, для цитометрического исследования и анализа молекулярно-биологических маркеров методом ПЦР – плазма крови пациентов, взятые из локтевой вены натошак в одноразовую стерильную пробирку без или с антикоагулянтом К<sub>2</sub>-ЭДТА., соответственно. Цитометрическое исследование проводили в день взятия крови. Материал гепатобиоптата (1-5 мм) отбирался врачами клиник при проведении плановой пункционной биопсии печени по общепринятому методу по Менгини.

Таблица 1. Объем клинико-лабораторных исследований

Название исследования	Кол-во человек
Выявление антител к ВГС в крови	1226
Выявление HBsAg в крови	1225
Определение анти-HBcor общ., анти-HBcor IgM, HBeAg, анти-HBe, анти-HBs	1144
Выявление анти-HGD IgG-антител	388
Количественное определение HBsAg в крови	80
Выявление РНК ВГС методом ПЦР	1226
Выявление ДНК ВГВ методом ПЦР	1031
Выявление РНК ВГD методом ПЦР	172
Определение вирусной нагрузки РНК ВГС методом ПЦР	196
Определение вирусной нагрузки ДНК ВГВ методом ПЦР	64
Генотипирование ВГС	196
Проточная цитофлюориметрия	136
Определение экспрессии мРНК генов хемокинов: CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC и соответствующих рецепторов: CCR6 и CXCR3.	73
Определение концентраций следующих цитокинов/хемокинов: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCL20/MIP3 $\alpha$ , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAC методом мультиплексного анализа.	137
Секвенирование ВГС	60
Секвенирование ВГВ	97
Секвенирование ВГD	30
Выявление ккзДНК ВГВ в гепатбиоптате	119
Количественное определение ккзДНК ВГВ в гепатбиоптате	112
ВСЕГО	

Распределение больных по стадиям заболевания проводилось на основании оценки выраженности фиброза в гепатобиоптате или согласно данным эластометрии в соответствии со стандартизированной системой «METAVIR» (F0 – отсутствие фиброза, F1 – слабый (портальный)

фиброз, F2 – умеренный (с порто-портальными септами), F3 – тяжелый (с порто-центрными септами) и F4 – цирроз

#### *Иммуноферментный анализ*

Определение антител к ВГС, качественное определение HBsAg, количественное определение HBsAg, определение анти-HBcor IgG, анти-HBcor IgM, HBeAg, анти-HBe IgG, анти-HBs IgG, анти-ВГD IgG выполняли методом ИФА с использованием диагностических наборов ЗАО «Вектор-Бест» и ООО «Диагностические системы» и с помощью иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛИА) на анализаторе Architect i1000sr («Abbott», США) с использованием соответствующих тест-систем согласно инструкции фирмы-производителя.

#### *Мультиплексный анализ в магнитном формате*

В плазме крови методом мультиплексного анализа проводили определение концентраций следующих цитокинов/хемокинов: IFN $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCL20/MIP3 $\alpha$ , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/ITAC на анализаторе MagPix (Millipore, США). Для этого использовали коммерческие тест-системы «Milliplex MAP» (Millipore, США), согласно инструкции производителя.

#### *Проточная цитофлюориметрия*

В цельной крови оценивали количественный состав субпопуляций лимфоцитов, несущих хемокиновые рецепторы CCR6, CXCR3 и CD38 методом проточной цитофлюориметрии. Для исследования количественного состава субпопуляций лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих на своей поверхности рецепторы CCR6 и CXCR3, использовали цитофлюориметры FACS Canto II (Becton Dickinson, США) и Navios (Beckman Coulter, США). Применяли окрашивание следующими моноклональными антителами (Beckman Coulter, США; Biolegend, США):

Антитело	Клон	Изотип	Флуорохром
CD3	UCHT	IgG1 Mouse	ECD, PE-Cy 7
CD4	13B8.2	IgG1 Mouse	APC-Alexa Fluor 700, APC
CD5	BL1a	IgG2a Mouse	FITC
CD8	B9.11	IgG1 Mouse	APC-Alexa Fluor 700
CD16	3G8	IgG1 Mouse	FITC
CD19	J3119	IgG1 Mouse	APC-Alexa Fluor 700
CD25	B1.49.9	IgG2a Mouse	PE
CD27	1A4CD27	IgG1 Mouse	PE-Cy 7
CD28	CD28.2	IgG1 Mouse	PE-Cy 5
CD38	T16	IgG1 Mouse	PE
CD45	HI30	IgG1 Mouse	APC-Alexa Fluor 700
CD45RA	ALB11	IgG1 Mouse	FITC
CD45RO	UCHL1	IgG2a Mouse	ECD
CD56	N901 (NKH-1)	IgG1 Mouse	PE-Cy 5,5
CD62L	DREG56	IgG1 Mouse	PE, ECD
CD127 (IL-7R $\alpha$ )	R34.34	IgG1 Mouse	APC
CD183 (CXCR3)	G025H7	IgG1 Mouse	APC
CD196 (CCR6)	G034E3	IgG2b Mouse	PE-Cy 7
HLA-DR	B8.12.2	IgG2b Mouse	FITC

Одновременно определялись маркеры CD3/CD16+CD56/CD45/CD4/CD19; CD19 /CD3 /CCR6 /CXCR3 /CD4; CD3 /CD16+CD56 /CCR6 /CXCR3 /CD8; CD5 /CD38 /CD27 /CXCR3 /CD19 /CD45; HLA-DR /CD38 /CD3 /CCR6 /CXCR3 /CD4; HLA-DR /CD38 /CD3 /CCR6 /CXCR3 /CD8; CD45RA /CD62L /CD3 /CCR6 /CXCR3 /CD4; CD45RA /CD62L /CD3 /CCR6 /CXCR3 /CD8; CD45RA /CD62L /CD3 /CD28 /CD27 /CD4 /CD8; HLA-DR /CD25 /CD62L /CD3 /CD127 /CD4 /CD45; CD16 /CD38 /CD3 /CD56 /CCR6 /CXCR3. В качестве контроля использовали: CD45 (для идентификации

популяций лейкоцитов и выделения лимфоцитарного гейта по малоугловому и боковому светорассеянию) и изотипический контроль IgG1/IgG2 (для контроля неспецифического связывания лимфоцитов с античеловеческими антителами и выделения негативного по флюоресценции лимфоцитарного гейта).

Для каждого из образцов анализировали не менее 50000 лимфоцитов, отвечающих указанным выше условиям. Анализ данных проводили с использованием программ Navios Software, Kaluza (Beckman Coulter, США), FACS Diva (Becton Dickinson, США).

#### *Молекулярно-биологические методы*

Выделение нуклеиновых кислот (НК) ВГВ, ВГС, ВГД проводили с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва).

Для ВГС и ВГД проводили обратную транскрипцию на неспецифичных праймерах с использованием коммерческого набора реагентов «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) для синтеза первой цепи кДНК согласно инструкции производителя. Образцы полученной кДНК хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Анализ проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» на наборах «АмплиСенс® HBV-FL», «АмплиСенс® HCV-FL», «АмплиСенс® HDV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) соответственно,

Выделение РНК/ДНК из биопсийного материала и крови проводили с использованием тризола (TRIzol® Reagent, Invitrogen, США). Образцы ткани предварительно инкубировали в тризоле (соотношение ткань:тризол не менее 1:10) в ультразвуковой мойке «Ultrasonic» (Elma, Германия) в течение 60 мин. Образцы крови инкубировали при комнатной температуре в тризоле (соотношение кровь:тризол не менее 1:3) в течение 60 мин. Далее выделяли по стандартному протоколу экстракции РНК/ДНК с тризолом. Для очищения выделенной РНК от примесей геномной ДНК непосредственно перед постановкой реакции обратной транскрипции образец обрабатывали ДНКазой (Fermentas, Германия). РНК в количестве 1-2 мкг инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут с 1 мкл (1 ед.) ДНКазы-I (Fermentas, Германия). После окончания инкубации к пробам добавляли 1 мкл 50 мМ ЭДТА и инактивировали фермент 10 минут при  $65^{\circ}\text{C}$ .

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 15 пМ каждого олигопраймера, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, рН 8,8), 200 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% (v/v) твин 20), 10% DMSO, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 25 мкл.

Для амплификации, секвенирования и детекции продукта использовали специфические праймеры и флуоресцентные зонды TaqMan (Синтол, Россия). Последовательность праймеров и флуоресцентных зондов брали из литературных источников, а также подбирали с помощью программы NCBI/Primer-BLAST согласно общепринятым рекомендациям (Overbergh L. et al., 2003).

#### *Секвенирование ДНК ВГВ, кДНК ВГС и кДНК ВГД*

Для ПЦР ВГВ с последующим секвенированием использовали перекрывающиеся пары праймеров, совместно фланкирующие фрагмент протяженностью 1475 пар оснований (п.о.), включающий рекомендованную для генотипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S протяженностью 1169 п.о. область 2848-3182...1-835 нт., согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту Mart-B47 (HE974377.1). Для ПЦР ВГС с последующим секвенированием использовали перекрывающиеся пары праймеров, фланкирующих фрагмент NS5B региона протяженностью 383 нуклеотида (нт), с 8256 нт по 8638 нт, согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту H77 (AF009606). Для ПЦР ВГД с последующим секвенированием использовали праймеры, фланкирующие фрагмент кДНК гипервариабельного участка гена, кодирующего дельта-антиген, длиной 397 нт, с 890 по 1287 нт, согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту (X04451).

Продукты первичной амплификации очищали с использованием набора реагентов Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Germany) согласно методике, рекомендованной производителем, либо методом спиртового осаждения в присутствии ацетата натрия.

Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в SLS-буфере и помещали в генетический анализатор GenomeLab GeXP (Beckman Coulter Inc., США).

*Анализ экспрессии мРНК цитокинов и их рецепторов*

Для исключения амплификации геномной ДНК, праймеры конструировали таким образом, чтобы один из них располагался на стыке экзонов, или два праймера располагали в разных экзонах. Tm праймеров, использовавшихся в работе, составляла 57-60 °С, Tm зондов – 68-72 °С.

Таблица 2. Первичная структура праймеров и зондов для определения экспрессии мРНК хемокинов и их рецепторов методом РТ-ПЦР с обратной транскрипцией

Ген	Олигонуклеотид	Последовательность
GAPDH	прямой праймер	ATCTTCCAGGAGTGAGCGAG
	обратный праймер	GACTCCACGACGTA CT CAGC
	Зонд	FAM-TCCAAAATCAAGTGGGGCGATG-BHQ1
CXCL9/MIG	прямой праймер	AGAAAGGGTTCGCTGTTCTCTG
	обратный праймер	GGGCTTGGGGCAAATTGTTT
	Зонд	CY5-CACCAACCAAGGGACTATCCACCTA-BHQ2
CXCL10/IP-10	прямой праймер	GCCATTCTGATTTGCTGCCT
	обратный праймер	GCAGGTACAGCGTACAGTTCT
	Зонд	CY5-CTGACTCTAAGTGGCATTCAAGGA-BHQ2
CXCL11/ITAC	прямой праймер	TGCCCAAAGGAGTCCAACAA
	обратный праймер	TCCGCTGGTAACCAGCCTTT
	Зонд	ROX-ATGGATTTCTAGGAAAAGCTACCT-BHQ2
CXCR3	прямой праймер	GTA CT TGAGGTGAGTGACCACC
	обратный праймер	GGTACAGCACGAGTCACTATAG
	Зонд	ROX-CGCCGAGGTTGCCGCCCTCCT-BHQ2
CCL20/MIP-3 $\alpha$	прямой праймер	GTGCTGCTACTCCACCTCTG
	обратный праймер	GGTCTGTGTATCCAAGACAGCA
	Зонд	CY5-GAATCAGAAGCAAGCAACTTT-BHQ2
CCR6	прямой праймер	ATGGCAGAACAGGTGTTGGT
	обратный праймер	TCCTAATGGCCCACTACAACC
	Зонд	ROX-AATTGTCACCAATTGGATAAAGCA-BHQ2

Количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе BioRad CFX96 (BioRad Laboratories, Inc.) с использованием наборов компании Синтол (Россия) и Fermentas (Германия). Для каждого образца реакцию проводили на двух технических репликатах, далее усредняли значение Ct для них. Анализ результатов проводился по методу относительного подсчета (метод дельта Ct) с нормализацией по эндогенному референс гену GAPDH (Schmittgen T. D. et al., 2008). Под относительной экспрессией понималось отношение  $E^{(Ct \text{ референс ген})} / E^{(Ct \text{ ген интереса})}$ , где E - эффективность реакции, Ct – пороговый цикл. Для оценки эффективности реакции для каждого гена делали серию разведений кДНК. Эффективность реакции автоматически рассчитывалась прибором.

*Филогенетический анализ. Статистическая обработка полученных данных*

Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 5, используя алгоритм ClustalW. Для построения

филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом невзвешенной попарной группировки с усреднением (UPGMA). Для оценки достоверности построенных деревьев проведен бутстреп (bootstrap) анализ для 500 повторностей.

Для статистической обработки данных использовали программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc.), JMP 11.0 (SAS Institute Inc.), MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.). Применялись стандартные методы непараметрической статистики. Полученные количественные данные представлены в виде медианы с указанием первого и третьего квартиля Me (Q1; Q3). При сравнении парных количественных значений использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Гипотезы рассматривались как статистически достоверные при  $p < 0,05$ . Корреляционные связи между двумя количественными параметрами вычисляли с помощью непараметрического метода ранговой корреляции Спирмена, выражая их с помощью коэффициента корреляции  $r$ . При сравнении нескольких групп использовали одномерный дисперсионный анализ ANOVA, для этого применяли тест Краскела-Уолиса. После нахождения значимых различий выполняли апостериорный тест помощью критерия Бонферрони.

При сравнении двух диагностических тестов проводили анализ кривых операционной характеристики (receiver operating characteristic curve - ROC,) с вычислением площади под кривой операционной характеристики (ППК). Качество диагностических маркеров оценивалась по экспертной шкале для значений ППК.

Метод построения деревьев решений программой JMP 11 использовался для нахождения оптимальной комбинации биомаркеров.

### **Исследование молекулярно-биологических и иммунологических маркеров вирусного гепатита В (результаты собственных исследований)**

Скрининговая лабораторная диагностика ВГВ основана на обнаружении трех пар антигенов и связанных с ними антител методом ИФА или более современных его разновидностей – иммунохемилюминисцентного или электрохемилюминисцентного анализов.

Одним из наиболее широко используемых в лабораторной диагностике ВГВ маркеров является HBsAg. Анализ на наличие в периферической крови пациента поверхностного антигена вируса гепатита В входит в список обязательных для установления инфицирования при госпитализации, постановке на учет, переводе из/в лечебное учреждение, получении санитарной книжки, получении разрешения на работу в РФ и пр. Однако в нашем исследовании данный маркер был выявлен только у 37,6% больных (Таблица 3). Причин для этого несколько.

Прежде всего, это низкая концентрация HBsAg в крови людей, инфицированных ВГВ как на ранней стадии заболевания, так и перед прекращением циркуляции HBsAg. Кроме того, низкая концентрация антигена характерна для микст-инфекций гепатита В и С, В и ВИЧ, а также низкая концентрация возможна при некоторых случаях коинфекции В и D. Содержание HBsAg в подобных случаях настолько невелико, что чувствительности ныне существующих коммерческих наборов недостаточно для его выявления.

Таблица 3. Результаты лабораторного обследования пациентов КИЗ с диагнозом ХВГВ (n=705)

Маркеры ВГВ	Абс. число	%
HBsAg	265	37,6
HBeAg	1	0,1
anti-HBcor IgM	4	0,6
anti-HBcor IgG	483	68,5
anti-HBe IgG	290	41,1
anti-HBs IgG	142	20,1
ДНК ВГВ	152	21,6
Не обнаружены	179	25,4

В связи с вышесказанным для верификации лабораторных данных было принято решение проанализировать ряд дополнительных маркеров: анти-НВs IgG, НВеAg, анти-НВе IgG, анти-НВсog IgG, анти-НВсog IgM.

Поскольку после исчезновения НВsAg в сыворотке выявляются анти-НВs IgG, в большинстве случаев остающиеся в крови, тем самым способствуя развитию некоторого иммунитета к инфекции ВГВ в дальнейшем, мы сочли необходимым включить в анализ этот маркер. Частота встречаемости анти-НВs IgG в обследованной группе составила 20,1% от общего количества пациентов и 27% от группы пациентов с какими-либо маркерами ВГВ соответственно. При количественном анализе выявлено, что концентрация анти-НВs IgG у этих пациентов превышает 10 МЕ/мл, так называемый лабораторный маркер «выздоровления». Ни у одного пациента из данной группы не было выявлено ДНК ВГВ. В нашем исследовании практически не были представлены пациенты с анти-НВs IgG и НВsAg в сыворотке одновременно, хотя известно, что это характерно почти для 25% больных. Таким образом, обширную часть исследованной нами группы можно характеризовать как выздоравливающих, рассматривая анти-НВs IgG в качестве надежного критерия развития постинфекционного иммунитета.

Тестирование на НВеAg и анти-НВе IgG в случае его использования является значимой частью оценки состояния пациента.

НВеAg, как правило, находится в сыворотке во время острой инфекции ВГВ и часто ассоциируется с высокой вирусной нагрузкой ДНК ВГВ в плазме. Постоянное присутствие НВеAg в сыворотке в течение многих лет ассоциировано с повышенным риском развития цирроза или ГЦК. Однако НВеAg-негативная форма заболевания может обозначать появление пресогe мутантного вируса, ассоциированного с более тяжелым исходом заболевания и требующего изменения в планах лечения. В нашей работе только у одного пациента выявлен НВеAg, при этом одновременно выявлены НВsAg(+), анти-НВсog IgM и ДНК ВГВ. Таким образом, большинство наших пациентов относятся к группе с НВеAg-негативным ХВГВ, отличающихся не только сравнительно более низкой концентрацией ДНК ВГВ в периферической крови, но и высокой вероятностью волнообразного течения заболевания.

Анти-НВе IgG, как известно, выявляют в крови больных преимущественно после снижения и полного исчезновения НВеAg. В нашем исследовании этот маркер имеет широкое распространение, частота встречаемости составила 41,1% среди исследованных нами пациентов в целом и более 55% в группе пациентов с какими-либо маркерами ВГВ.

Следующим маркером, выявление которого мы рассматриваем как необходимый элемент общего скрининга, является анти-НВсog IgG и IgM. Анти-НВсog IgM выявляются в процессе острой вирусной инфекции и затем, как правило, уровень их в течение полугода снижается до неопределяемого. По некоторым данным, низкий уровень анти-НВсog IgM может выявляться во время эпизодов реактивации ХВГВ. В нашем исследовании таких больных выявлено менее 1%, при этом у всех пациентов с анти-НВсog IgM определяли НВsAg-позитивный и ДНК ВГВ в крови, что позволяет определить фазу обострения и может служить косвенным подтверждением вышесказанного.

В качестве альтернативы используют анализ сыворотки пациентов на анти-НВсog IgG, именно анти-НВсog IgG являются классическим маркером ВГВ, так как все пациенты, сталкивающиеся с ВГВ, отвечают образованием НВсog IgG антител, что является более чувствительным диагностическим маркером инфицированности. Выявление анти-НВсog IgG у 68,5% исследованных нами пациентов в целом и, фактически, у 91,8% пациентов с какими-либо маркерами ВГВ в первую очередь подтверждает инфицирование. Также обращает на себя внимание обширная группа НВsAg-отрицательных пациентов, у которых из всех серологических маркеров выявляется только анти-НВсog IgG, при этом у 4,8% определили ДНК ВГВ. В отсутствие специфических молекулярно-биологических методов выявление анти-НВсog IgG как единственного серологического маркера, является свидетельством оккультного гепатита В. В нашей работе частота встречаемости оккультного ВГВ составила 14,9% исследованных нами пациентов в целом и, фактически, 20% пациентов с какими-либо маркерами ВГВ. Очевидно, что

для лабораторной диагностики такой формы гепатита недостаточно лабораторного определения только HBsAg, как минимум пациента необходимо обследовать на наличие анти-HBcor IgG методом ИФА и ДНК ВГВ методом ПЦР.

Таким образом, все обследованные пациенты были распределены на группы, в зависимости от обнаруженных серологических маркеров: инфицирования (n=384) и иммунологического выздоровления (n=142).

Пациенты с различным сочетанием маркеров инфицирования ВГВ были отнесены к одной из 6 групп в зависимости от сочетания выявленных лабораторных маркеров (Таблица 4). Пациенты групп I-IV были с антителами HBcorIgG и с различной репликативной активностью вируса, сопровождающейся продукцией HBsAg и сборкой вирусных частиц. ДНК ВГВ выявляется в плазме крови большей части пациентов из этих групп. Например, в группе 3 - наиболее характерная для пациентов форма HBeAg-негативного ХВГВ - ДНК ВГВ показана у 60,0% больных.

Пациенты группы V-VI с IgG антителами к коровому антигену ВГВ (HBcorAg) и без выявления HBsAg из серологических маркеров инфекции были положительными по анти-HBe IgG и анти-HBcor IgG антителам (группа V) или, в большинстве случаев, только анти-HBcor IgG (группа VI). При этом ДНК ВГВ определяется в 7,1 % и 4,8 % случаев соответственно, что составляет 5% (n=6) от общего числа пациентов с HBsAg-негативным ХВГВ или 1,6% от числа всех пациентов с лабораторно подтвержденным ХВГВ.

Таблица 4. Определение ДНК ВГВ у пациентов с различными сочетаниями маркеров инфицированности ВГВ (n=384)

Группа	I	II	III	IV	V	VI
Маркеры	HBsAg (+), n=265				HBsAg (-), n=119	
	n=1	n=4	n=252	n=8	n=14	n=105
	HBeAg анти - HBcor IgM	анти- HBcor IgM	анти-HBe IgG анти-HBcor IgG	анти-HBcor IgG	анти-HBe IgG анти-HBcor IgG	анти- HBcor IgG
ДНК ВГВ, %	100,0	100,0	60,0	37,5	7,1	4,8
	60,0				5,0	

Таким образом, при углубленном серологическом анализе те или иные маркеры ВГВ были выявлены и охарактеризованы у 74,6% пациентов, большинству из которых, как уже было сказано выше, при стандартном исследовании был бы поставлен неверный диагноз.

Последняя группа из 25,4% пациентов с предварительным диагнозом ХВГВ была отрицательной по всем серологическим маркерам ВГВ. Одной из распространенных причин ложноположительных результатов анализа является, как и в случае с ложноотрицательными результатами, человеческий фактор. Исключая человеческий фактор, также нельзя быть уверенным в истинности полученного результата, если диагностика проводилась только по одному маркеру. Так, например, было показано, что сродством могут обладать и, соответственно, проявляться в виде положительного ответа в ИФА, например, при анализе анти-HBcor IgG, схожие белки, вырабатываемые иммунной системой и образующиеся в ответ на попадание в организм чужеродных агентов. Также было показано, что распространенность ложноположительных результатов анализа при использовании HBsAg и/или анти-HBcor скрининговых тестов у женщин достоверно выше чем у мужчин (Narciso-Schiavon J. et al., 2015).

Представляется целесообразным обсудить вопрос о рациональности и обоснованности существующего алгоритма лабораторного обследования пациентов с ХВГВ, поскольку существующий алгоритм лабораторной диагностики не охватывает все возможные варианты течения хронической формы ВГВ и не приспособлен для выявления случаев occultного ХВГВ. Внедрение в диагностический алгоритм исследований на анти-HBcor антитела и ДНК ВГВ

позволит значительно повысить эффективность лабораторного скрининга и увеличить выявляемость пациентов с оккультной формой ХВГВ.

Согласно некоторым данным количественное определение HBsAg на 12 и 24 неделе терапии ПЕГ-ИФН может способствовать пониманию эффективности лечения, предотвращать длительное лечение у пациентов, не отвечающих на терапию и, напротив, подтверждать необходимость продолжения лечения у пациентов с положительным ответом. Так, например, у HBeAg-негативных пациентов наблюдается снижение уровня HBsAg в ответ на лечение. В то же время при сохранении уровня HBsAg > 20 000 МЕ/мл у HBeAg-позитивных ХВГВ после 24 недель лечения ПЕГ-ИФН необходимо прекращение терапии, независимо от генотипа пациента (Sonneveld M. et al., 2013).

Многочисленные исследования сообщают об изменении содержания HBsAg в крови на разных этапах естественного течения ХВГВ. Было показано, что уровень HBsAg наиболее высок в фазе «иммунной толерантности», постепенно снижается в фазе «иммунного клиренса», уменьшается при HBeAg-негативном гепатите, а наиболее низок у неактивных носителей (Brunetto M. et al., 2010). При этом низкие уровни HBsAg у неактивных носителей прогнозируют спонтанные потери HBsAg. Эти данные полностью совпадают с полученными нами результатами, согласно которым уровень HBsAg в периферической крови у пациентов с ХВГВ ( $2559 \pm 982$  МЕ/мл) значительно выше, чем у неактивных носителей ( $940 \pm 259$  МЕ/мл).

Вирусная нагрузка у пациентов с ХВГВ, составившая в среднем  $540 \pm 230$  МЕ/мл при отсутствии ДНК ВГВ у неактивных носителей с низким уровнем HBsAg в крови согласуется с данными, указывающими на тесную зависимость между уровнями HBsAg и ДНК ВГВ, предполагающую высокую виремию у пациентов с высоким уровнем HBsAg. Согласно современным рекомендациям по ведению пациентов с ХВГВ, основной целью терапии ХВГВ является предотвращение прогрессирования хронического заболевания в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному за счет устойчивого снижения уровня репликации вируса вплоть до недетектируемых величин (Sorrell M. et al., 2009). Таким образом, группа неактивных носителей HBsAg не нуждается в активной противовирусной терапии, а подлежит диспансерному наблюдению с целью своевременного выявления возможной реактивации ХВГВ. Пока критерием, позволяющим выявить истинных неактивных носителей HBsAg, является метод ПЦР. Несмотря на высокую информативность методов ПЦР, продолжают поиски иных лабораторных маркеров, позволяющих дифференцировать стадии ХВГВ. При этом варьирование вирусной нагрузки в исследованной нами группе больных с ХВГВ в пределах 230-1170 МЕ/мл подтверждает предположение о сложной кинетике зависимости между уровнями HBsAg и ДНК ВГВ, способной меняться на каждой стадии заболевания. Например, в нашей работе прямая корреляция между концентрацией HBsAg в сыворотке крови и репликативной активностью ДНК ВГВ ( $r=0,79$ ,  $p=0,0001$ ) показана у больных в фазе иммунного контроля. Корреляция высоких уровней HBsAg и ДНК ВГВ на ранних стадиях ХВГВ, а также диссоциация после сероконверсии HBeAg, свидетельствует о различии элементов управления, отвечающих за репликацию ВГВ и за продукцию HBsAg.

Одним из критериев для разделения «истинных» неактивных носителей (т.е. таких, где реактивация не наблюдается в течение длительного времени) и неактивных носителей из группы потенциального риска служит количественное определение ДНК ВГВ в плазме крови. Считается, что при уровне ДНК ВГВ > 2000 МЕ/мл значительно возрастает риск развития цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы, даже при уровне АЛТ в пределах нормальных значений. Пациенты с нормальными значениями АЛТ и уровнем ДНК ВГВ < 2000 МЕ/мл относятся к неактивным носителям, нуждающимся в динамическом наблюдении с определением уровня АЛТ каждые 6-12 месяцев. Однако данные литературы (Malmström S. et al., 2012) показывают, что минимум у 22% пациентов с уровнем ДНК ВГВ < 2000 МЕ/мл и нормальным уровнем АЛТ происходит реактивация неактивного носительства и переход его в ХВГВ с умеренной или даже высокой активностью в течение 1,5-2 лет наблюдения. Предлагается ужесточить критерий выделения «истинных» неактивных носителей, для чего новым критерием выделения этой группы



послужит критический уровень ДНК ВГВ  $< 200$  МЕ/мл (Kim E. et al., 2011), что достаточно близко к нижней границе чувствительности большинства тест-систем для количественного определения ДНК ВГВ. Например, использованная нами в этой работе тест-система для количественного определения ДНК ВГВ имеет нижний порог аналитической чувствительности при стандартном выделении ДНК в 150 МЕ/мл. В настоящем исследовании мы ориентировались на предложенные новые, более строгие критерии выделения «истинных» неактивных носителей.

При измерении количественного содержания HBsAg в сыворотке крови выявляются также достоверные различия между «истинными» неактивными носителями и пациентами с ХВГВ, даже если проводить это разделение по более жесткому критерию вирусной нагрузки ДНК ВГВ  $< 200$  МЕ/мл. При этом полученные в настоящей работе данные, несмотря на небольшую выборку, позволяют вполне уверенно разделять группы пациентов. По данным полученной выборки можно сделать заключение о перспективности применения количественного определения HBsAg для скрининга пациентов с ХВГВ и адекватного выделения группы неактивных носителей ВГВ.

Как уже было сказано выше, возможно, оценка уровня анти-HBcor IgG одновременно с HBsAg станет эффективным дополнением для разделения фаз ХВГВ.

Несмотря на многочисленные работы, как подтверждающие значимость ккзДНК ВГВ в развитии заболевания, так и противоречащие этому, недостаточно исследований, использующих этот единственный надежный диагностический маркер, особенно в РФ и странах СНГ. В результате проведенных исследований был отработан метод количественного определения ккзДНК ВГВ в ткани печени пациентов. Благодаря постэкстракционному применению нуклеазы Mung bean удалось разделить ккзДНК и циркулирующую в инфицированных гепатоцитах геномную ДНК ВГВ в силу селективной тропности нуклеазы к одноцепочечным молекулам ДНК, в том числе частично незамкнутым кольцевым молекулам (как в случае геномной ДНК ВГВ).

Выявление кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ проводили согласно методике Pollicino T. С соавт.(2004), с использованием TaqMan зондов для real-time ПЦР. Предварительно ДНК обрабатывали эндонуклеазой MungBean («Сибэнзим») из расчета 1 ед фермента на 1 мкг ДНК, согласно протоколу производителя, для удаления одноцепочечных ДНК и РНК и расщепления геномной ДНК ВГВ (частично-кольцевой). Для каждого образца реакцию проводили в трех повторностях, далее усредняли значение  $C_t$  для них. Анализ результатов проводился по методу относительного подсчета (метод дельта  $C_t$ ) с нормализацией по эндогенному референс гену. Для оценки эффективности реакции для каждого гена делали серию разведений образца. Эффективность реакции автоматически рассчитывалась прибором. Использовали следующие праймеры ВГВ:

fp23 5-CTGAATCCTGCGGACGACCC-3, rp24 5-CCCAAGGCACAGCTTGGAGG-3, fp25b 5-GTCTGTGCCTTCTCATCTGCC-3, rp26b 5-AGAGATGATTAGGCAGAGGTG-3, probeTaqMan ROX-TGTGCACTTCGCTTCACCTCTGC-BHQ2.

В качестве внутреннего контроля использовали два референс гена. Ген GAPDH: fp 5-ATCTTCCAGGAGTGAGCGAG-3, rp 5-GACTCCACGACGTACTCAGC-3, probeTaqMan FAM-TCCAAAATCAAGTGGGGCGATG-BHQ1. Ген  $\beta$ -глобина: fp 5-CTGGGCAGGCTGCTGGTG-3, rp 5-GCTTGTACAGTGCAGCTC-3. Подбор условий и выполнение исследования проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad).

Для количественной стандартизации амплификации с праймерами HBV P23 и HBV P24 использовали предварительно охарактеризованные с помощью набора «АмплиСенс HBV – Монитор – FRT» для количественной амплификации образцы ДНК ВГВ. Для количественной стандартизации амплификации с праймерами гена  $\beta$ -глобина использовали предварительно количественно охарактеризованные лейкоцитарные взвеси, полученные из образцов периферической крови.

Положительный результат выявления ДНК ВГВ в ткани печени у всех пациентов, вне зависимости от результатов определения ДНК ВГВ в периферической крови, соответствует современным представлениям о патофизиологическом механизме ВГВ (EASL Clinical Practice Guidelines, 2012), а также коррелирует с активностью инфекционного процесса. Следует

подчеркнуть, что один из возможных неблагоприятных вариантов течения неактивного носительства HBsAg является реактивация ХВГВ, при которой происходит значительное возрастание репликативной активности вируса и в ткани печени накапливается ккзДНК.

В группе из 34 пациентов с ХВГВ, разделенной на подгруппы из 18 больных с истинным ХВГВ и 16 неактивных носителей HBsAg, различие в количественном содержании HBsAg в сыворотке крови отражает различия в степени инфицированности гепатоцитов ВГВ: если у пациентов с ХВГВ инфицирован практически каждый гепатоцит (от 0,3 до 2 копий генома ВГВ в виде ккзДНК на клетку), то у неактивных носителей соотношение инфицированных и неинфицированных клеток печени было значительно ниже и колебалось от 1:120 до менее чем 1:3 клетки.

В группе из 46 пациентов, разделенных по фазам естественного течения ХВГВ, при анализе содержания ккзДНК ВГВ в ткани печени достоверных различий в уровне между фазами иммунного контроля и реактивации обнаружено не было:  $1,02 \pm 0,01$  копий/клетку и  $1,03 \pm 0,03$  копий/клетку,  $p=0,72$  соответственно. Однако, у больных ХВГВ в фазе иммунного контроля, как и в первой группе, выявлена прямая корреляция между уровнем ккзДНК (количество копий на клетку) и количественным содержанием HBsAg в сыворотке крови ( $r=0,51$ ;  $p=0,03$ ).

В третьей группе из 15 пациентов с ХВГВ с выраженным фиброзом и циррозом печени при количественной оценке содержания ккзДНК ВГВ в тканях печени было показано в среднем 2,5 копий/клетку (от 0,9 до 2,7 копий генома ВГВ в виде ккзДНК на клетку).

При низком содержании ккзДНК ВГВ в клетках печени должен понижаться синтез специфических вирусных белков, что совпадает с полученными результатами по количественному определению HBsAg и соответствует данным из литературных источников (Levrero M. et al., 2009). Таким образом, полученные нами результаты согласуются с результатами работ Alghamdi и др. (2013) о том, что уровни HBsAg, коррелируя с общим содержанием ДНК ВГВ в печени, скорее могут отражать транскрипционно-активную ккзДНК, а не её абсолютное количество, при этом HBsAg в сыворотке, вероятно, характеризует количество ккзДНК только при ее большой концентрации в ткани печени.

Несмотря на отсутствие в нашей работе достоверной корреляции между уровнем ккзДНК ВГВ в ткани печени и уровнем ДНК ВГВ в сыворотке в фазе иммунного контроля, наблюдается тенденция к ее появлению ( $r=0,37$ ,  $p=0,06$ ), и она может быть обнаружена при дальнейших исследованиях с расширенными группами пациентов, что согласуется с мнением некоторых авторов, считающих, что ДНК ВГВ коррелирует с уровнями ккзДНК и общей ДНК в ткани печени у нелеченых (HBeAg «-») пациентов с ХВГВ (Manesis E. et al., 2011).

Значительно более высокий уровень содержания ккзДНК ВГВ в ткани печени в группе больных с выраженным фиброзом и циррозом печени по сравнению с больными в фазах иммунного контроля и реактивации может служить подтверждением значимости оценки репликативной активности в гепатоцитах для предиктивной оценки развития патологий печени (Guner R. et al., 2011; Zhu C. et al., 2002).

Нами была исследована группа из 11 пациентов с первичным диагнозом ХВГС с выраженным фиброзом и циррозом печени (F3-4), у 6 из которых в тканях печени была выявлена кольцевая ковалентно замкнутая ДНК ВГВ. При предварительных анализах с использованием общепринятых методов с помощью коммерческих наборов маркеры ВГВ, включая ДНК ВГВ в плазме крови и в биоптатах, выявлены не были. Таким образом, частота выявления оккультного ВГВ у больных ХВГС составила 54,5%.

Так как ВГВ и ВГС имеют сходные факторы риска и пути передачи, выявление оккультного ВГВ у пациентов с ХВГС вполне ожидаемо. Инфицирование двумя вирусами одновременно или последовательно часто встречается в регионах, с высокой заболеваемостью вирусными гепатитами. Высокий процент обнаружения у больных ХВГС оккультного ВГВ, вероятнее всего, объясняется способностью ВГС препятствовать репликации и экспрессии генов ВГВ.

При этом тяжелое состояние наших пациентов согласуется с данными иностранных коллег, показавших, что наличие оккультного ВГВ у больных ХВГС коррелирует с тяжестью заболевания печени, с развитием фиброза и цирроза печени и с уменьшением ответа на терапию ПЕГ-интерфероном (Torbensohn M. et al., 2002), что может становиться причиной негативного влияния на исход заболевания (Branco F. et al., 2007; El-Sherif A. et al., 2009). Однако оккультный ВГВ гораздо более распространенное явление у больных с терминальной стадией ХВГС, чем можно было ожидать, учитывая его распространенность среди населения в целом.

При количественной оценке содержания ккзДНК ВГВ в тканях печени показано: у пациентов с ХВГС в среднем 0,12 копий/клетку (от 0,03 до 0,2 копий генома ВГВ в виде ккзДНК на клетку). В группе из 6 пациентов с ХВГС с выраженным фиброзом и циррозом печени с сопутствующими инфекциями при количественной оценке содержания ккзДНК ВГВ в тканях печени было показано: у пациентов с ХВГВ+D в среднем 0,7 копий/клетку (от 0,5 до 1,0 копий генома ВГВ в виде ккзДНК на клетку), у пациентов с коинфекцией ВГС+ВГВ 0,5 и 0,4 копий/клетку.

Низкой уровень соотношения инфицированных и неинфицированных клеток печени у больных с двойной инфекцией, в том числе HBsAg-негативных, согласуется с работами коллег, показавших низкий уровень репликации ВГВ при совместном инфицировании с ВГС и ВГД.

Выявление оккультного ВГВ у всех пациентов с криптогенным гепатитом является, по всей видимости, следствием малой выборки. Мы предполагаем, что при увеличении группы больных частота распространенности оккультного ВГВ у таких пациентов уменьшится, но, тем не менее, будет достаточно высока. Это предположение косвенно подтверждается результатами работ иностранных коллег, согласно которым в регионах с высокой заболеваемостью парентеральными вирусными гепатитами у людей с тяжелыми заболеваниями печени при отрицательном HBsAg оккультный ВГВ встречается с частотой 59%, а у больных гепатоцеллюлярной карциномой до 85% (Pollicino T. et al., 2014; Wong D. et al., 2011).

При этом низкий уровень ккзДНК ВГВ в печени пациентов с криптогенным гепатитом по сравнению с уровнем у больных ХВГВ не противоречит данным других исследователей (Arica B. et al., 2015; Wong D. et al., 2015).

Определение генотипов и субтипов ВГВ крайне информативно для достоверной оценки эпидемиологических и вирусологических особенностей течения инфекционного процесса и дает дополнительную информацию для принятия решения о противовирусной терапии. Роль генотипов ВГВ вероятном исходе острого ГВ, частоте хронизации и ответе на ПВТ ПЕГ-ИФН убедительно продемонстрирована. Известно, что при терапии интерфероном частота УВО значительно чаще достигается у пациентов с генотипами А и В, чем при инфицировании, вызванном, генотипами D и С. HBeAg-негативный вариант течения ХВГВ, а также высокие темпы развития цирроза ассоциированы с генотип D. При этом для различных генотипов и субтипов ВГВ показано характерное географическое распределение.

Как и предполагалось, исходя из данных о географической распространенности генотипов ВГВ, все обследованные пациенты были инфицированы ВГВ генотипа D, представленного тремя субтипами с различной частотой встречаемости.

Наиболее распространенным генотипом в обследованной группе пациентов из Якутии был субтип D2 (85,8 %) по сравнению с субтипом D3 (14,2 %) ВГВ. Поскольку субтип D2 является наиболее распространенным по всей территории России, то обнаружение ВГВ преимущественно этого субтипа D2 являлось ожидаемым. При анализе степени идентичности нуклеотидных последовательностей группы изолятов субтипа D2 (Рисунок 1) была выявлена идентичность  $99,0\% \pm 0,2\%$  нуклеотидов, что совпадает с данными других авторов (Tallo T. et al., 2008).

Согласно данным эпиданамнеза диагноз ХВГВ в группе обследованных пациентов был установлен на протяжении 18 лет (1994-2012 гг.), но, несмотря на столь продолжительный период проникновения возбудителя в популяцию, была выявлена низкая степень гетерогенности проанализированных штаммов ВГВ. Анализ данных о времени постановки диагноза ХВГВ

показал, что целый ряд представленных изолятов ВГВ могут циркулировать на территории Якутии на протяжении, как минимум, нескольких десятилетий.

Несмотря на значительную гомогенность нуклеотидных последовательностей, исследованная группа изолятов субтипа D2 распадается на кластеры, с внутренней идентичностью нуклеотидной структуры до 100%. Выявлено несколько кластеров, в т. ч. из 9, 5, 3 и 2 изолятов.

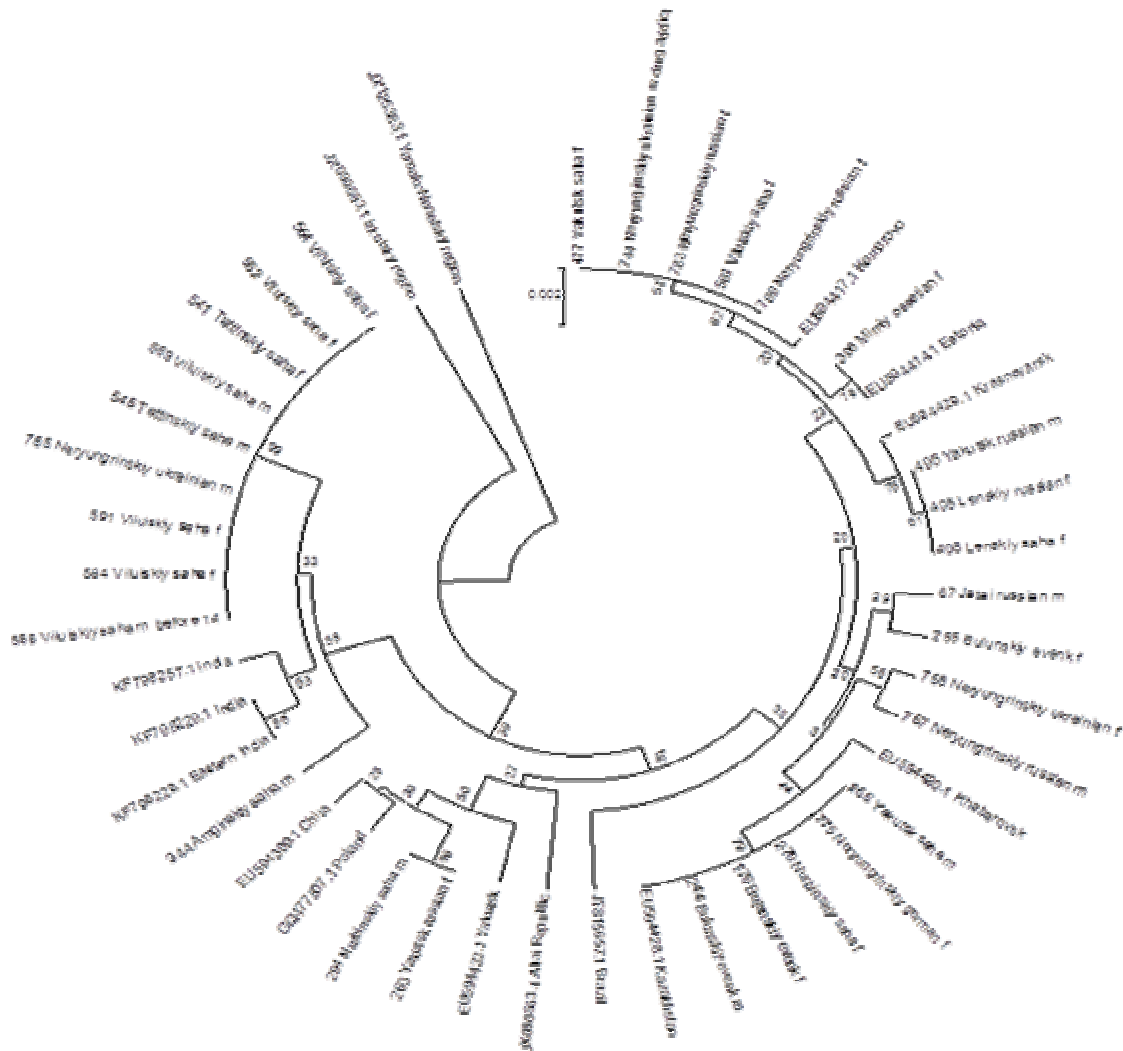


Рисунок 1. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВГВ субтипа D2, выделенных от пациентов с ХВГВ из разных регионов Якутии, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank последовательностями максимально идентичных штаммов ВГВ из других регионов России и зарубежных стран.

В работе Ramachandran S. et al. (2014) была ранее продемонстрирована возможность образования многокомпонентных кластеров с высокой (вплоть до полной идентичности) степенью сходства Pre-S1/Pre-S2/S региона генома ВГВ у многочисленных изолятов, выделенными в географически удаленных регионах на протяжении длительного периода времени. Однако расширение анализируемой области генома до полногеномного секвенирования позволяет разделить изоляты для установления филогенетических связей между выделенными изолятами, что позволяет выявить эпидемические связи между пациентами из географически отдаленных регионов. Повышение разрешающей способности филогенетического анализа позволяет выявлять поздние эпидемиологические связи у больных ХВГВ из разных географических регионов (Tallo T. et al., 2004), а также устанавливать общее происхождение изолятов. Было принято решение проанализировать отдельные кластеры изолятов ВГВ субтипа D2. Для секвенирования области,

включающий Pre-S1/Pre-S2/S регион и регион Core-гена, проводили ПЦР с дополнительными парами праймеров. Общая длина амплифицируемого фрагмента составляла 2274 п.о. (по сравнению с ранее полученными фрагментами длиной 1475 п.о.).

Состав кластера №1 включал в себя 9 изолятов с №№ 541, 546, 558, 562, 564, 569, 584, 591, 785. Был проведен анализ первичной нуклеотидной последовательности изолятов №№ 541, 546, 558, 562, 569, 591, 785. Анализ нуклеотидной последовательности амплифицированного фрагмента изолятов данной группы позволил разделить кластер на две подгруппы с процентом нуклеотидной идентичности между подгруппами 96%, в пределах подгрупп 99%-100% (Рисунок 2).

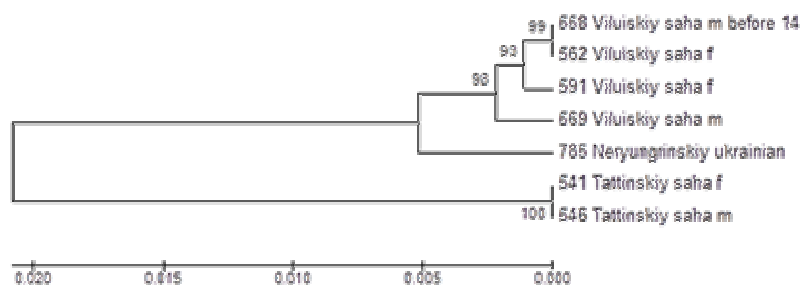


Рисунок 2. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов субтипа D2 ВГВ проанализированного на основании нуклеотидной идентичности Pre-S1/Pre-S2/S региона кластера №1. Материал выделен от пациентов с ХВГВ из разных регионов Якутии.

Анализ родственных отношений в группе пациентов, от которых получены данные изоляты ВГВ дал дополнительную важную информацию для понимания возможных эпидемических связей в этой группе. Установлено, что пациентка 591 является матерью пациентки 562 и бабушкой пациента 558. Все проживают в Вилюйском районе Саха-Якутии. Пациенты 564, 569 и 584 также проживают в Вилюйском районе. Одновременно установлено, что пациент 546 (также инфицированы ХВГВ его сестра и мать) является отцом пациента 558, все проживают в Таттинском районе Саха-Якутии. У пациентки 541, проживающей в Таттинском районе, выявлена мать инфицированная ХВГВ. Все включенные в кластер пациенты являются представителями национальности саха. В пользу гипотезы о вертикальном пути распространения вируса в группе свидетельствует высокая степень идентичности нуклеотидных последовательностей проанализированных изолятов ВГВ. Данная ситуация, по всей видимости, представляет собой случай внутрисемейного очага ВГВ с возможной вертикальной передачей (Рисунок 3).

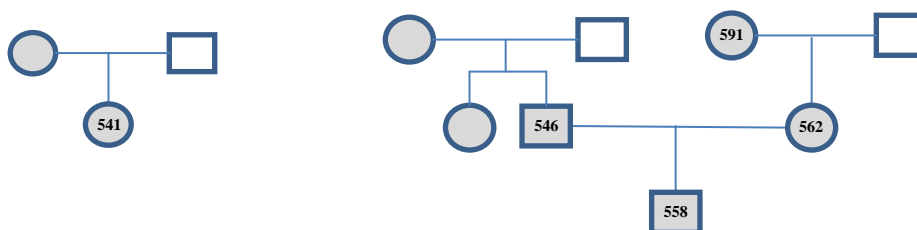


Рисунок 3. Характеристика семейных связей некоторых пациентов кластера №1.

● - ХВГВ, □ –статус неизвестен.

Вероятно предположение, что изначально были инфицированы матриархи данных семей, что может быть обусловлено национальными культурными традициями и/или недостаточной обеспеченностью медицинской помощью региона в середине 20-го века.

Субтип D3 ВГВ, встречается относительно редко на территории Российской Федерации и более характерен для Северной Африки, Средиземноморья и Северной Америки. Однако субтип D3 был выявлен у 14,2% пациентов из Саха-Якутии. Анализ последовательностей ДНК изолятов субтипа D3 выявил 99% идентичности первичной последовательности между собой. При этом

отмечено значительное отличие последовательностей выявленных изолятов из Якутии от представленных в международной базе данных GeneBank изолятов, выделенных из относительно близких к Якутии регионов - Красноярского края и Ханты-Мансийского автономного округа.

Полноценный анализ распространенности различных геновариантов ВГВ затруднен низкой представленностью первичных нуклеотидных последовательностей в международной базе данных Genbank. По состоянию на октябрь 2016 г., из более чем 90000 геномов и фрагментов геномов ВГВ, депонировано только 525 нуклеотидных последовательностей ВГВ из России, несмотря на обширность территорий и значительную численность населения. Данное обстоятельство становится серьезной проблемой не только для оценки распространенности генотипов гепатита В и анализа эпидемиологической ситуации в России, странах бывшего Советского Союза и географически близких регионах, но и для оценки распространенности оккультного ВГВ, а также для выявления корреляций состояния печени и генетического профиля больных.

Сравнительный филогенетический анализ выявленных в нашей работе изолятов из Узбекистана, и представленных в международной базе данных GenBank последовательностей, показано высокое сходство ВГВ генотипа D (Рисунок 4). Для пациентов с выраженным фиброзом/циррозом печени из Узбекистана показано преобладание ВГВ субтипа D1 (84,38 %) по сравнению с ВГВ субтипа D2 (3,12 %) и субтипа D3 (12,5 %).

Выявление в исследуемой группе только ВГВ генотипа D в противоположность ранее показанному в Узбекистане распространению не только генотипа D (77,5%), но также А (15,0%) и С (7,5%) (Даминов Т. А. и др., 2003), имеет, вероятно, несколько причин. Одной из них может быть отбор в исследуемую группу пациентов с тяжелыми заболеваниями печени. ВГВ генотипа D способен вызывать более серьезные заболевания, в том числе коррелирует с более тяжелыми заболеваниями печени, и более высокий уровень лекарственной устойчивости по сравнению с другими генотипами этого вируса (Khedive A. et al., 2013). При этом известно, что для ВГВ субтипа D1, преобладающего в данной группе, характерна низкая вирусная нагрузка и ранняя сероконверсия HBeAg, что может создавать проблемы для своевременного выявления вируса у пациентов и, в свою очередь, приводить к развитию более тяжелого поражения ткани печени (Ozaras R. et al., 2015).

В качестве второй причины можно рассматривать введение в 1998 г. вакцинации против гепатита В в Узбекистане. Как уже было сказано выше, оценка результатов вакцинации показала, что в группе вакцинированных детей был распространен только ВГВ субтипа С, причем перинатальным путем передачи вируса. Для невакцинированных был показан горизонтальный путь распространения ВГВ субтипов D и А (Avazova D. et al., 2008). В исследуемой нами группе представлены взрослые люди, родившиеся до введения программы иммунизации, вероятнее всего инфицированные горизонтальным путем передачи вируса, и, очевидно, это также может быть составной частью причины, по которой в исследованной нами группе представлен ВГВ только субтипа D.

Необходимо обратить пристальное внимание на клиническую и диагностическую значимость глубокого типирования ВГВ, в особенности относительно широко распространенного на территории бывшего СССР генотипа D. Хотя в России циркулирует преимущественно субтип D2, велика вероятность завоза субтипа D1 из стран Средней Азии. При этом для ВГВ субтипа D1 показана высокая частота мутаций в промоторе гена Core, ассоциированных с развитием гепатоцеллюлярной карциномы (Kim B. et al., 2012). В то же время двойная мутация, приводящая к уменьшению или предотвращению синтеза HBeAg, значительно чаще встречается у ВГВ субтипа D1 (33,3 %), чем у субтипа D2 (8,3 %) (Banerjee P. et al., 2014).

Сравнение проводилось по укороченному фрагменту нуклеотидных последовательностей, соответственно с длиной образцов, представленных в GenBank. При этом обращает на себя внимание близкое сходство ВГВ субтипов D1 и D3.

Таким образом, высокое сходство нуклеотидных последовательностей выявленных нами изолятов ВГВ у пациентов в группе с гепатитом с выраженным фиброзом и циррозом печени с

описанными ранее штаммами показывает эндемичность представленных субтипов для данного региона.

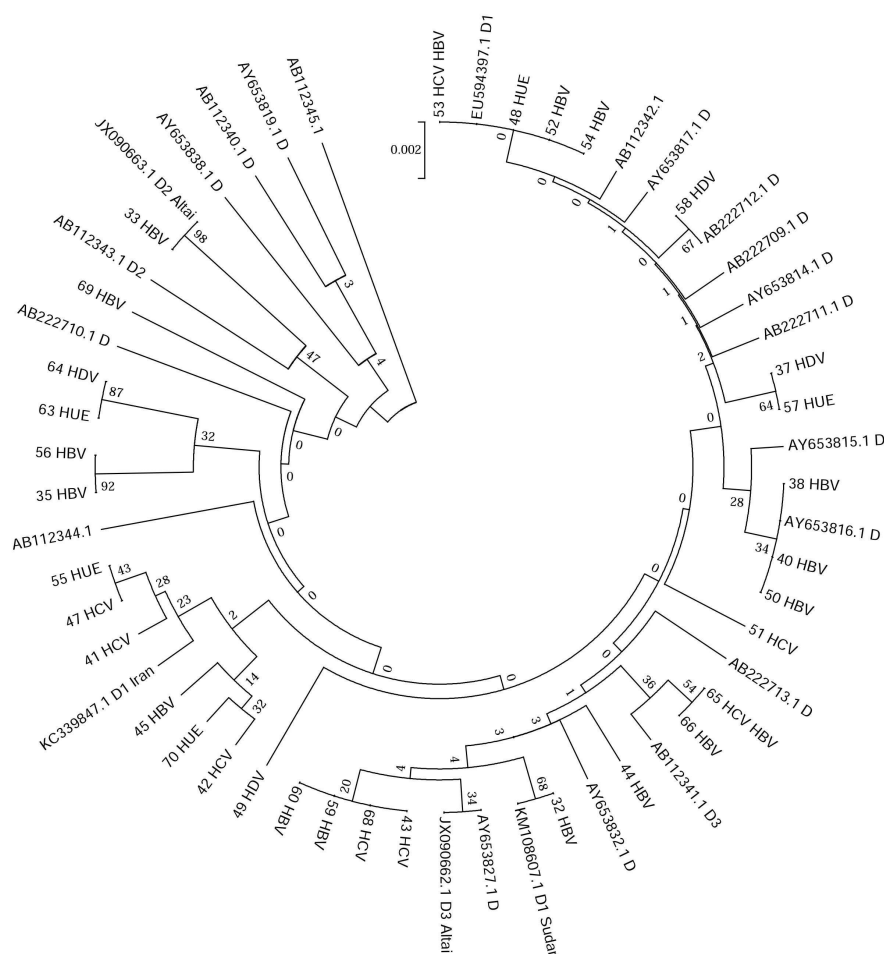


Рисунок 4. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВГВ генотипа D из Узбекистана, проанализированных в настоящем исследовании в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank последовательностями ранее полученных изолятов ВГВ.

Примечание: HBV – ХВГВ, HCV – ХВГС, HDV – ХВГВ+D, HUE – гепатит неясной этиологии.

Отдельно следует отметить, что при анализе нуклеотидной последовательности Pre-S1/Pre-S2/S региона у больных с оккультным ВГВ показано преобладание субтипа D1 (91 %) и только у одного человека выявлен субтип D3 (9 %).

Несмотря на то что некоторые работы показывают совпадение частот распространенности генотипов и субтипов оккультного ВГВ с распределением генотипов ВГВ в том или ином регионе, также продемонстрирована характерность преобладания генотипа D для оккультного ВГВ (Brechot C. et al., 2001; Kishk R. et al., 2014). Так, например, в Корее, где преобладающим в популяции (более 90%) генотипом ВГВ является С, но при оккультной форме ХВГВ преобладает генотип D (75%) (Kim K. et al., 2014). При этом считается, что вирус с генотипом D может быть более предрасположен к потере HBsAg.

Таким образом, нельзя сказать, что выявленное нами преобладание ВГВ субтипа D1 у больных с оккультным ВГВ коррелирует с распределением генотипов ВГВ в Узбекистане. Однако высокая частота встречаемости данного генотипа в Центральной Азии наводит на мысль о возможности широкого распространения оккультного ВГВ в регионе. Это представляется

особенно значимым в связи с известной возможностью передачи инфекции от «оккультных» носителей ВГВ (Chazouilleres O. et al., 1994).

### **Исследование молекулярно-биологических и иммунологических маркеров вирусного гепатита D (результаты собственных исследований)**

Тяжелые заболеваний печени значительно более выражены при коинфекции или суперинфекция ВГВ и ВГD по сравнению с моноинфекцией вирусом гепатита В. Исследование встречаемости серологических и молекулярно-биологических маркеров хронических вирусных гепатитов у больных с хроническим вирусным гепатитом В с активным течением инфекции и выраженными биохимическими маркерами повреждения печени показала высокую распространенность серонегативного варианта течения ВГD среди пациентов с хроническим вирусным гепатитом В.

Для выявления случаев микст-инфекции ВГВ+ВГD было проведено обследование 246 HBsAg-положительных пациентов на наличие антител к вирусу гепатита D (анти-ВГD IgG). Частота встречаемости анти-ВГD IgG составила 3,2% от группы HBsAg-положительных больных ХВГВ и 1,5% от группы пациентов с какими-либо маркерами ВГВ, что соответствует средней распространенности заболеваемости ВГD на территории Европейской части РФ (Левитан Б. Н. др., 2001). При этом в 75% случаев микст-инфекция ВГВ + ВГD сопровождалась активной репликацией ВГВ с детектируемым уровнем ДНК ВГВ в плазме крови пациентов.

Несмотря на по-прежнему актуальный характер инфекции, лабораторная диагностика ВГD, как и десятилетия назад, основана на выявлении анти-ВГD антител IgM и IgG класса. Однако возможен вариант замедленного или отсроченного антителообразования, когда анти-ВГD IgG образуются со значительной задержкой во времени либо вообще не образуются (Wedemeyer H. et al., 2010).

При обследовании группы пациентов (n=405) с критериями отбора (АЛТ>2N, HBsAg(+), HbcorIgG(+), HCV IgG+IgM (-)) были выявлены только 142 пациента с наличием маркеров ХВГВ и повышением уровня АЛТ (см. Таблица 5).

Таблица 5. Выявление РНК ВГD у анти-ВГD IgG серопозитивных и серонегативных пациентов с ХВГВ

Маркеры	анти-ВГD IgG (+)	анти-ВГD IgG (-)	Всего
ПЦР РНК ВГD (+)	19 (13,4%)	12 (8,4%)	31 (21,8%)
ПЦР РНК ВГD (-)	4 (2,8%)	107 (75,3%)	111(78,2%)
Всего	23 (16,2%)	119 (83,8%)	142 (100%)

Серологические маркеры инфицирования ВГD были выявлены у 16,2% (n=23) обследованных пациентов с активным течением вирусного гепатита. Полученные нами вышеописанные данные подтверждают встречаемость маркеров ВГD инфекции на уровне 3-5% среди HBsAg-положительных пациентов без выраженного уровня повышения АЛТ. Однако частота встречаемости маркеров инфицирования ВГD среди пациентов с активным течением ХВГВ значительно выше, чем среди общего числа инфицированных ВГВ, что согласуется со значительным повышением уровня АЛТ (как показателя повреждения гепатоцитов) среди пациентов обследованной группы. При этом у абсолютного большинства серопозитивных по анти-ВГD IgG пациентов (19 из 23) обнаружение антител к ВГD коррелирует с выявлением маркера репликации ВГD. Только у 17,4% серопозитивных по анти-ВГD IgG пациентов результат ПЦР РНК ВГD был отрицательным. Это может свидетельствовать в пользу ранее перенесенного ХВГВ+D и наличия анамнестических антител к ВГD. Подобные результаты вполне согласуются с литературными данными (Hsieh T. et al., 2006).

Однако в значительном числе случаев обнаружение РНК ВГD не сопровождалось выявлением анти-ВГD IgG+IgM, что составило 38,7% от всех ПЦР РНК ВГD(+) случаев и 8,5% от всех обследованных пациентов с активным течением ХВГВ. Вполне вероятно, что значительное



повышение уровня АЛТ у пациентов с ПЦР ВГВ ДНК (-) может быть обусловлено именно ко- или суперинфицированием ВГД, в том числе без образования серологических маркеров инфицирования. Если у большей части пациентов (59,1%, n=84) повышение АЛТ можно связать с активной репликацией ВГВ, то столь высокая (21,8%, n=31) частота обнаружения репликативной активности ВГД может быть причиной повышения АЛТ у пациентов с отрицательным результатом ПЦР ДНК ВГВ.

Обнаружение столь значительного числа пациентов с серонегативным течением гепатита D среди пациентов с ХВГВ убедительно демонстрирует необходимость введения в алгоритм лабораторной диагностики ХВГВ молекулярно-биологического обследования на РНК ВГД.

Анализ 30 изолятов из Кыргызстана выявил вирус гепатита D I типа, обладающего наиболее высоким хронизирующим потенциалом, по сравнению со II и III генотипами, и самого распространенного в мире.

Сравнительный анализ полученных фрагментов генома ВГД проводился с максимально идентичными штаммами из международной базы данных GeneBank, характерными для географических регионов, соседствующих с Кыргызстаном, а также варианты генотипов ВГДИ и ВГДИИ (Рисунок 5).

Анализ выявил высокую гетерогенность исследуемого участка гена, кодирующего дельта-антиген. Тем не менее у исследованных в нашей работе и представленных в международной базе данных изолятов ВГД степень сходства весьма велика. Несмотря на гетерогенность относительно друг друга изолятов из Кыргызстана, вариабельность внутри генотипа возможна только в узких пределах. Объяснением такой внутригрупповой вариабельности вируса могут быть два процесса: с одной стороны гетерогенность вируса гепатита D в пределах генотипа может отражать эволюцию вируса с древнейших времен. Кыргызстан является не только сравнительно закрытым географическим регионом, но и регионом с высокой распространенностью гепатита D. Второй причиной гетерогенности вируса могут быть многочисленные независимые заносы возбудителя на территорию. В пользу этого может свидетельствовать высокое сходство выделенных изолятов с изолятами из Монголии с территории которой было несколько крупных миграционных волн.

Наиболее вероятно, что оба фактора вносили свой вклад в генетическую гетерогенность ВГД. Генетическое сходство полученных на территории Кыргызстана изолятов со штаммами, выявленными в географически близлежащих странах, прекрасно иллюстрируется рисунком 5. А вот уже возникновение целого кластера изолятов, существенно отличающихся от ближайших генетических соседей можно объяснить локальным мутационным процессом в пределах закрытого региона. (Lee C. et al., 1992).

По мере изучения ВГД, все чаще появляются сведения о высокой вариабельности гепатита D и выявлении географически ассоциированных подтипов, что обусловлено высокой частотой мутации характерной для ВГД. Это затрудняет генотипирование вируса, т. к. одни исследователи предлагают идентифицировать такие группы как новые генотипы/субгенотипы вируса (Le Gal F. et al., 2012; Perveen S. et al., 2012), в то время как другие считают неоправданным раздробление классификации на мелкие ранги (Shirvani-Dastgerdi E. et al., 2014). Типирование ВГД на основании различий полиморфных вариантов гипервариабельного гена, кодирующего дельта-антиген, безусловно, остается открытым вопросом и нуждается в дальнейших исследованиях.

Применение филогенетического анализа выявляемых изолятов вирусов ГВ и ГД с использованием как дополненной данными из общедоступных источников групп изолятов, так и на основе полногеномного секвенирования выделенных изолятов, а также выявление их ассоциации с полиморфными вариантами гепатита В, предоставляет более полную информацию о формировании подгрупп в филогенетической ветви ВГДИ, что должно быть использовано для более глубокого анализа путей распространения вируса гепатита В и сопутствующего гепатита D.

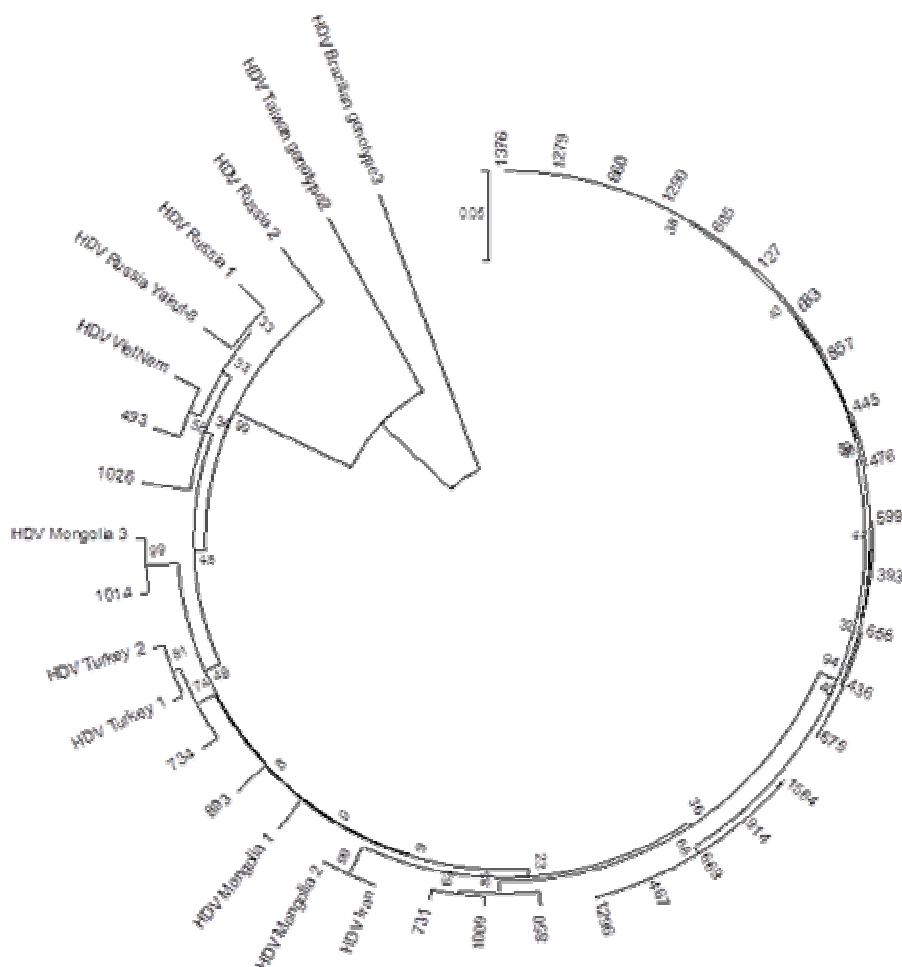


Рисунок 5. Филогенетическая связь между изолятами вируса гепатита D из Кыргызстана и штаммами, представленными в международной базе данных, на основании гипервариабельного участка гена, кодирующего дельта-антиген (UPGMA, bootstrap N=500).

### **Исследование молекулярно-биологических и иммунологических маркеров вирусного гепатита С (результаты собственных исследований)**

Поскольку главной целью нашей работы был подбор маркеров, способных характеризовать повреждения печени при вирусных гепатитах и оценка их значимости в лабораторной диагностике, были выбраны некоторые цитокины, которые, как известно, играют ключевую роль в нормальных и в патологических процессах в организме, координируя действия разнообразных клеток.

Было показано, что TNF $\alpha$ , уровень которого в плазме крови больных ХВГС значительно превышает значения контрольной группы, может с высокой достоверностью использоваться в качестве маркера заболевания. TNF $\alpha$ , регулируя интенсивность воспаления и иммунного ответа, определяет интенсивность развития местных и системных патологических процессов. Секрция TNF $\alpha$  возрастает под влиянием пептидов ВГС. Капсидный (core) и неструктурный (NS3) белки, связываясь с рецептором врожденного иммунного ответа TLR2, в активированных моноцитах повышают продукцию TNF $\alpha$  (Izaguirre A. et al., 2003). В настоящем исследовании была выявлена положительная корреляционная связь между содержанием в крови цитокина TNF $\alpha$  и хемокинов: CCL2/MCP-1 ( $r=0,35$ ,  $p=0,002$ ), CCL4/MIP-1 $\beta$  ( $r=0,31$ ,  $p=0,007$ ), CXCL9/MIG ( $r=0,28$ ,  $p=0,017$ ), CXCL10/IP-10 ( $r=0,35$ ,  $p=0,003$ ), CXCL11/ITAC ( $r=0,33$ ,  $p=0,005$ ). Как описано ранее, под воздействием TNF $\alpha$  возрастает секрция в периферическую кровь хемокинов MCP, MIP и

некоторых других (Mantovani A. et al., 2011), что подтверждают результаты и нашего исследования.

Определение содержания  $TNF\alpha$  в крови больных в динамике развития ХВГС может быть использовано как дополнительный лабораторный критерий прогрессирования заболевания, что подтверждается полученными результатами.

Концентрация  $CXCL9/MIG$ ,  $CXCL10/IP-10$  и  $CXCL11/ITAC$  значительно возрастает при ХВГС, что указывает на их роль в иммунопатогенезе заболевания (Tacke F. et al., 2011). Ранее была показана связь с процессом фиброобразования печеночной паренхимы нарастание содержания некоторых  $CXC$ -хемокинов (Wasmuth, H. et al., 2009), что подтверждается и данными настоящего исследования.

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют об увеличении концентрации некоторых хемокинов  $CC$ -класса в плазме крови больных ХВГС и во многом согласуются с данными других авторов. Наиболее выражена взаимосвязь между степенью фиброза печени и нарастанием цитокинов и хемокинов  $CXCL10/IP-10$ ,  $CXCL11/ITAC$ ,  $TNF\alpha$ ,  $CCL2/MCP-1$  и  $CXCL9/MIG$  (Таблица 6).

Таблица 6. Зависимость между степенью фиброза печени и уровнем цитокинов и хемокинов плазмы крови.

	r	p
$IFN\gamma$	0,13	0,1916
$TNF\alpha$	0,48	< 0,0001
$CCL2/MCP-1$	0,42	< 0,0001
$CCL3/MIP-1\alpha$	0,07	0,5062
$CCL4/MIP-1\beta$	0,18	0,0776
$CCL5/RANTES$	0,01	0,8965
$CCL8/MCP-2$	0,12	0,2398
$CCL20/MIP-3\alpha$	0,35	0,0004
$CXCL9/MIG$	0,38	0,0001
$CXCL10/IP-10$	0,70	< 0,0001
$CXCL11/ITAC$	0,52	< 0,0001

Функция хемокинов  $CXCL9/MIG$ ,  $CXCL10/IP-10$  и  $CXCL11/ITAC$  заключается в привлечении в очаг воспаления мононуклеарных клеток, в основном активированных лимфоцитов, несущих на своей поверхности хемокиновый рецептор  $CXCR3$  (Larrubia J. et al., 2007). Их продукция запускается через  $IFN\gamma$ -зависимый сигнальный путь (Simpson K. et al., 2003). Целый ряд публикаций убедительно показал, что повышение концентрации  $CXCL10/IP-10$  в крови при ХВГС, в том числе за счет его секреции гепатоцитами (Shields P. et al., 1999) и клетками синусоидального эндотелия (Tan, A. et al., 2010). Ангиостатические хемокины, к которым относятся  $CXCL9/MIG$ ,  $CXCL10/IP-10$  и  $CXCL11/ITAC$ , в норме тормозят развитие фибротического процесса, но по данным настоящего исследования и литературы, они усиливают процесс повреждения печеночной ткани и нарастания фиброза. Объяснение этого противоречия заключается в том, что  $CXCL10/IP-10$  в периферической крови находится в антагонистической форме, которая образуется под воздействием дипептилпептидазы IV ( $DPP4$ ,  $CD26$ ) и способна к связыванию с  $CXCR3$  рецептором, но без передачи сигнала на внутриклеточный мессенджер, роль которого выполняет G-белок (Casrouge A. et al., 2011). Результатом становится возрастание содержания в крови больных ХВГС дефектных форм хемокинов вызывающих реакции воспаления. Определение содержания хемокинов  $CXCL9/MIG$ ,  $CXCL10/IP-10$  и  $CXCL11/ITAC$  может быть использовано в лабораторной диагностике для мониторинга развития ХВГС.

При хронических заболеваниях печени CCL2/MCP-1 секретируют гепатоциты, эпителиальные клетки желчных протоков, клетки Купфера и звездчатые клетки (Heumann F. et al., 2008). Количество макрофагов, экспрессирующих CCR2, лигандом которого является CCL2/MCP-1, значительно увеличивается в ткани печени при ХВГС (Ваеск, С. et al., 2012). Следствием этого становится усиление воспаления, с последующим стеатозом и стимуляцией ангиогенеза (Karlmark K. et al., 2009), что и приводит к замещению печеночной паренхимы соединительной тканью (Ehling, J. et al., 2014).

Нами выявлена прямая зависимость между содержанием CCL2/MCP-1 в плазме крови и степенью фиброза печени, что согласуется с данными литературы (Matta F. et al., 2002). Известно, что при развитии ХВГС значительно нарастает тканеспецифичная и ассоциированная именно с повреждаемой тканью печени экспрессия гена CCL2/MCP-1, что приводит к увеличению количества мРНК CCL2 в гепатоците (Жданов К. В. и др., 2007). Являясь хемоаттрактантом для звездчатых клеток, играющих ключевую роль в процессах фиброгенеза, CCL2/MCP-1 также привлекает моноциты/макрофаги в очаг воспаления. Механизм профибротической активности ангиостатического хемокина CCL2/MCP-1, видимо, близок к таковому у CXCL10 (Casrouge A. et al., 2011). С другой стороны, этот процесс не снижает рекрутирующие свойства молекулы CCL2/MCP-1, которая продолжает привлекать в очаг воспаления макрофаги и Т-лимфоциты, вызывающие дополнительное повреждающее действие на ткань печени. Таким образом, CCL2/MCP-1 потенцирует воспалительную реакцию и повреждение клеток печени, запуская несколько параллельных клеточных процессов.

В плазме крови больных ХВГС происходит значительное нарастание концентрации CCL20/MIP-3 $\alpha$ , которое достоверно связано с нарастанием степени фиброза печени. В развитии процессов иммунорегуляции ткани печени хемокин CCL20/MIP-3 $\alpha$  принимает активное участие. В то время как рецептор этого лиганда CCR6 экспрессируется на различных клетках, в том числе на активированных Т-лимфоцитах, Т- и В-клетках памяти (Oo Y. et al., 2012). Основной синтез CCL20/MIP-3 $\alpha$  при воспалении ткани печени происходит в перипортальных дендритных клетках и резидентных макрофагах. Мозаичность секреции различных хемокиновых сигналов в той или иной ткани одного органа существенно влияет на распределение клеточных популяций, например, в различных анатомических структурах печени. Так клетки, экспрессирующие на своей поверхности рецептор CXCR3, будут накапливаться преимущественно в паренхиме печени, в то время как клетки несущие рецептор CCR6 будут мигрировать по ходу желчных протоков. Для Т-регуляторных и Th17-клеток характерна крайне высокая степень экспрессии рецептора CCR6 на поверхности. Изменение баланса этих клеток способно как индуцировать, так и ограничить развития аутоиммунного воспаления.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют, что по мере фиброзирования печеночной ткани возрастает уровень СС-хемокинов CCL2/MCP-1 и CCL20/MIP-3 $\alpha$  в периферической крови. Измерение их концентрации может быть использовано в лабораторной диагностике как суррогатные маркеры повреждения ткани печени при ХВГС.

Формирование цирроза и рака печени не является детерминированным исходом ХВГС и у большей части больных на протяжении всей жизни такой исход заболевания маловероятен. Тем не менее 15-20% пациентов представляют собой группу риска, в которой существует вероятность развития цирроза и рака печени в течение 20-30 лет заболевания (Alter H. et al., 2000). Современные успехи противовирусной терапии ХВГС, особенно появление препаратов прямого противовирусного действия, позволяют эффективно элиминировать вирус даже на поздних стадиях фиброза/цирроза печени. Более того, на фоне проводимой терапии, существует возможность реверсивного развития фиброза печени с восстановлением функциональной активности паренхимы (Ismail M. et al., 2009). Таким образом, максимально точная диагностика стадий фиброза печени с применением малоинвазивных лабораторных методов остается актуальной задачей. Данные проведенного ROC-анализа свидетельствуют о том, что одним из наиболее информативных среди исследованных нами цитокинов/хемокинов являлся

CXCL11/ITAC. Определение CXCL11/ITAC в плазме крови больных ХВГС может быть использовано для разделения начальных стадий фиброза печени (F0-1 и F2).

Поскольку ни один из исследованных показателей не обладал способностью с высокой чувствительностью разделить больных ХВГС по стадиям заболевания в зависимости от фиброза печени (F0-1, F2 и F3-4) было принято решение использовать смешанный диагностический алгоритм для определения стадии фиброза печени у больных ХВГС. С целью разработки такого диагностического алгоритма был использован дискриминантный анализ, позволивший отобрать три наиболее информативных биомаркера: CXCL11/ITAC, TNF $\alpha$  и CCL20/MIP-3 $\alpha$ . С помощью программы JMP11 был выбран метод регрессионного дерева или метод дерева решений. Метод был выбран, поскольку способен работать как с категориальными, так и с интервальными переменными. Прочие методы работают лишь с теми данными, где присутствует лишь один тип переменных. Наилучшие результаты были показаны при совместном определении концентрации хемокинов CXCL11/ITAC, TNF $\alpha$  и CCL20/MIP-3 $\alpha$  в периферической крови больных ХВГС, что является достаточным для информативной оценки степени фиброза печени у больных ХВГС (см. Рисунок 6). Вычисленные значения ППК для этих цитокинов составили более 0,8, что говорит об очень хорошем качестве выбранной модели. Результатом анализа стали определенные пороговые значения дифференциальной диагностики стадий фиброза F1 и F2: CXCL11/ITAC - 166,5 пг/мл, TNF $\alpha$  - 15,7 пг/мл, CCL20/MIP-3 $\alpha$  - 10,6 пг/мл; для дифференциальной диагностики стадий фиброза F2 и F3: TNF $\alpha$  - 15,8 пг/мл, CXCL11/ITAC - 301,8 пг/мл, CCL20/MIP-3 $\alpha$  - 15,5 пг/мл. Использование этого диагностического алгоритма определения стадий фиброза печени позволяет достигнуть чувствительности метода 67-91% при достаточной специфичности. В результате одновременного определения концентрации этих трех цитокинов с последующим анализом по предложенному алгоритму позволяет получить дополнительную информацию о стадии развития фиброза печени при ХВГС. Малоинвазивный характер получения биологического материала позволяет использовать этот метод неоднократно, что позволит наблюдать за темпами прогрессирования фиброза печени в динамике и своевременно принимать решение о начале противовирусной терапии.

Исследована возможность использования этой модели для других форм гепатита, а именно – вирусного гепатита В и аутоиммунных форм - АИГ и ПБЦ. Для сравненных групп эффективность использования предложенной модели на других нозологиях не подтверждается. Для абсолютного большинства пациентов с различными стадиями фиброза модель предполагает стадию F0-1, что не соответствует истине.

При более детальном анализе выявляется несовпадение критериев классификации. Модель предполагает стадию фиброза выше первой при следующем цитокиновом профиле - CXCL11/ITAC больше 166,5 пг/мл, TNF $\alpha$  от нуля до 15,7 пг/мл, CCL20/MIP3 $\alpha$  больше 10,6 пг/мл. Для аутоиммунного гепатита не выполняется одно из первых двух условий, ни для третьей, ни для четвертой стадии. Для ПБЦ – не выполняется одно из трех. Для хронического гепатита В – как правило, выполняется второе условие, концентрация TNF $\alpha$  от нуля до 15,7 пг/мл, однако не выполняется первое либо третье. Таким образом, наличие даже таких общих тенденций позволяет предположить существование закономерностей цитокинового профиля у пациентов с каждым из описанных заболеваний. Описание этих закономерностей может позволить построить аналогичные аналитические модели для этих заболеваний.

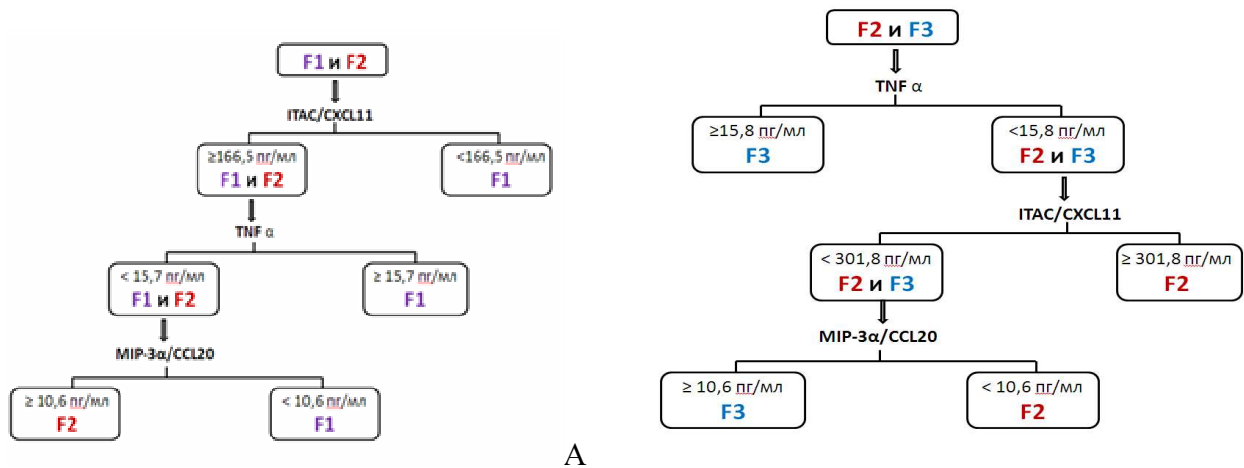


Рисунок 6. Дерево решений для разделения групп больных ХВГС с разными стадиями фиброза печени. На рисунке А представлено дерево решений для разделения групп больных ХВГС с F1 и F2, Б – для разделения групп больных с F2 и F3.

Выявлена, в результате проведенного исследования, статистически достоверная зависимость между генотипом ВГС и изменением содержания CCL8/MCP-2 у больных ХВГС: концентрация CCL8/MCP-2 в плазме крови была достоверно выше в группе пациентов, инфицированных 1-м генотипом ВГС (Рисунок 7а). Одним из возможных объяснений явления может быть способность ВГС модулировать иммунный ответ. Исследования, касающиеся роли CCL8/MCP-2 в иммунопатогенезе ХВГС, малочисленны. Секреция хемокина CCL8/MCP-2 свойственна целому ряду клеток, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, моноциты и макрофаги. Повышение концентрации хемокина CCL8/MCP-2 может являться следствием воспаления, вызываемого белками ВГС именно 1-го генотипа.

Наше исследование выявило положительную корреляцию между концентрацией хемокина CXCL9 и содержанием АСТ в плазме крови больных ХВГС (Рисунок 7б). Выявленная закономерность позволяет использовать определение CXCL9/MIG в качестве одного из дополнительных лабораторных тестов.

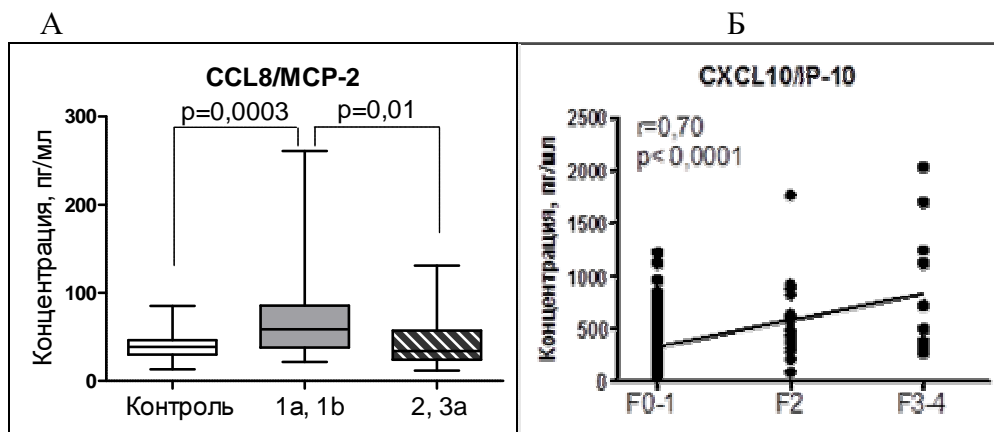


Рисунок 7. А - Концентрация CCL8/MCP-2 в плазме крови больных, инфицированных разными генотипами ВГС; Б -Зависимость между содержанием АСТ и CXCL9/MIG в плазме крови больных ХВГС

По результатам определения концентраций цитокинов/хемокинов в периферической крови, для дальнейшего исследования были выбраны субпопуляции лимфоцитов, несущие на своей поверхности хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6. Как было упомянуто выше, лигандами этих

рецепторов являются хемокины CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/ITAC и CCL20/MIP-3 $\alpha$ . Методом проточной цитометрии было определено содержание Т-лимфоцитов (CD4+ и CD8+), В-лимфоцитов, NK- и TNK-клеток в периферической крови.

Исследование содержания CXCR3+ В-лимфоцитов в крови больных ХВГС показало, по сравнению с контрольной группой, более чем трехкратный прирост их количества. Это совпадает с ранее опубликованными данными литературы (Oliviero V. et al., 2011). Вместе с тем, обнаружена достаточно выраженная корреляция между стадией фиброза печени и абсолютным ( $r=0,41$ ) или относительным ( $r=0,39$ ) содержанием В-клеток, экспрессирующих на своей поверхности рецептор CXCR3 в крови больных ХВГС. Таким образом, по мере прогрессирования фиброза печени происходит увеличение содержания CXCR3+CD19+ клеток у больных ХВГС. Дефект функций В-лимфоцитов возникает в случае постоянной антигенной стимуляции, что характерно при развитии хронической вирусной инфекции и выражается в истощении В-клеток (Moir S. et al., 2008). Показана взаимосвязь между нарастанием экспрессии рецептора CXCR3 на поверхности В-клеток и активностью репликации ВГС (Racanelli V. et al., 2006). Антигенная стимуляция белками ВГС, приводящая к избыточной активации В-лимфоцитов без образования эффективного гуморального иммунного ответа, вероятно, является одним из пусковых механизмов аутоиммунных осложнений при ХВГС. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что возрастание содержания CXCR3+ В-клеток в крови больных ХВГС служит неблагоприятным признаком развития заболевания. Данная субпопуляция клеток может быть использована, как дополнительный иммунологический критерий для наблюдения за прогрессированием фиброза печени.

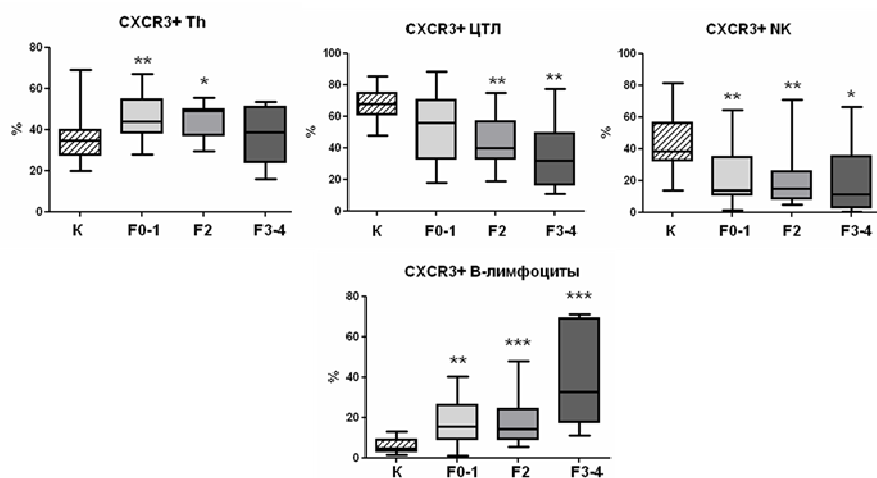
Полученные нами результаты согласуются также с данными, что CD27+ В-лимфоциты менее подвержены апоптозу чем CD27– В-лимфоциты (Racanelli, V. et al., 2007) и соответственно могут находиться в повышенном количестве в периферической крови. Это согласуется с гипотезой об увеличении субпопуляции В-клеток памяти при постоянной антигенной стимуляции, имеющей место при ХВГС, равно как и при иных хронических инфекционных заболеваниях.

В крови больных ХВГС, как показали результаты настоящего исследования, значительно увеличивалось содержание лимфоцитов по сравнению с контрольной группой, в том числе за счет Т-клеток. При развитии фибротического процесса, вызванного ХВГС, также и изменялся состав малых субпопуляций Т-лимфоцитов. Для стадий заболевания со слабым или умеренным фиброзом (F0-F2) было характерно повышенное содержание Т-клеток, в то время как по мере развития тяжелого фиброза/цирроза печени их количество уменьшалось, незначительно превосходя норму. Данные настоящего исследования согласуются с теорией об истощении специфических Т-лимфоцитов в условиях постоянной антигенной стимуляции при ХВГС, когда антигены вируса постоянно присутствуют в организме (Penna A. et al., 2007). Следствием этого истощения является ослабление Т-клеточного ответа, направленного против меньшего числа эпитопов, и связанного с феноменом «клонального истощения» (Наследникова И. О. и др., 2005) и нарушения функций противовирусных Т-лимфоцитов, которые частично ограничивают репликацию вируса, но не способны его эффективно элиминировать (Rehermann V. et al., 2013).

Исследование CXCR3+ Т-лимфоцитов в крови больных ХВГС показало увеличение как абсолютного так и относительного их количества по сравнению с контрольной группой. Поскольку Т-клетки представляют собой гетерогенную популяцию, содержащую CD4+ Th-клетки и CD8+ ЦТЛ, то было проведено исследование субпопуляций с иммунофенотипом CD3+/CD4+/CXCR3+ и CD3+/CD8+/CXCR3+ (Рисунок 8).

У больных ХВГС происходит достоверное увеличение в периферической крови содержания CXCR3+Th. Известно, что популяция Т-хелперов гетерогенна и включает субпопуляции Th1, Th2, Th17, регуляторные Т-клетки, активированные Th, Th-памяти и другие. Считается что рецептор CXCR3 экспрессируется в основном на поверхности Th1-клеток, но он может быть представлен и на других субпопуляциях CD4+ Т-клеток, в том числе и на Th2 (Kim C. et al., 2001; Oo Y. et al., 2010). Ранее было показано значительное возрастание количества CXCR3+ В-клеток в крови больных ХВГС и смещения цитокинового равновесия в сторону индукции Th2 иммунного ответа

(Никитин В. Ю. др., 2007). Таким образом, смещение баланса CXCR3+CD4+ Т-клеток в сторону субпопуляции Th2-клеток способствует пролонгации воспалительного процесса, что может вызывать аутоиммунные реакции, характерные для ХВГС (Zhang L. et al., 2014).



\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

Рисунок 8. Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновый рецептор CXCR3 в периферической крови больных ХВГС с различными стадиями фиброза.

При исследовании содержания в крови больных ХВГС CXCR3+CD8+ Т-лимфоцитов было показано снижение относительного количества этих клеток, при возрастании абсолютного количества CXCR3+ ЦТЛ. Известно, что исход острого вирусного гепатита С связан не с количеством ЦТЛ в крови, а с их способностью обеспечить эффективный противовирусный ответ (Kaplan D. et al., 2007). У больных ХВГС CD8+ Т-клетки обладают сниженной функциональной активностью. Учитывая тот факт, что рецептор CXCR3 участвует в привлечении специфических ЦТЛ в очаг воспаления в печени, активируя их, то снижение экспрессии CXCR3 на CD8+ Т-клетках за счет подавления иммунного ответа вирусом укладывается в концепцию снижения функциональной активности этой субпопуляции. Одним из механизмов персистенции ВГС считают подавление клеточного звена иммунитета вирусом и активация гуморального, что подтверждают данные нашего исследования. Количество циркулирующих в кровотоке CXCR3+ ЦТЛ заметно снижается, при том, что у больных ХВГС повышается содержание лигандов этого рецептора в плазме крови. Снижение экспрессии рецептора CXCR3 на поверхности CD8+ Т-лимфоцитов является результатом ускользания ВГС от иммунного ответа организма хозяина и может считаться неблагоприятным прогностическим признаком развития ХВГС.

В крови больных ХВГС была проведена оценка относительного и абсолютного содержания CXCR3+ NK и TNK-клеток. Обнаружено значительное снижение относительного количества обеих субпопуляций. Таким образом вирус гепатита С использует механизм подавления функций цитотоксических клеток, что позволяет эффективно персистировать в организме, избегая контроля иммунной системы. Развитие ХВГС сопровождается функциональными нарушениями эффекторных функций NK и TNK-клеток у больных. Таким образом, NK- и TNK- клетки, как и вышеописанные CD8+ Т-лимфоциты, находятся в состоянии сниженной функциональной активности, что выражается в снижении экспрессии хемокинового рецептора CXCR3 на поверхности лимфоцитов исследованных субпопуляций (Jinushi M. et al., 2004).

Для оценки выраженности воспалительной реакции была исследована экспрессия мРНК генов хемокиновых рецепторов и их лигандов в ткани печени больных ХВГС. В гепатобиоптатах больных ХВГС с выраженным фиброзом/циррозом печени по сравнению со слабо выраженным и



умеренным фиброзом печени обнаружено значительное возрастание экспрессии мРНК генов рецепторов CCR6 и CXCR3 (Рисунок 9).

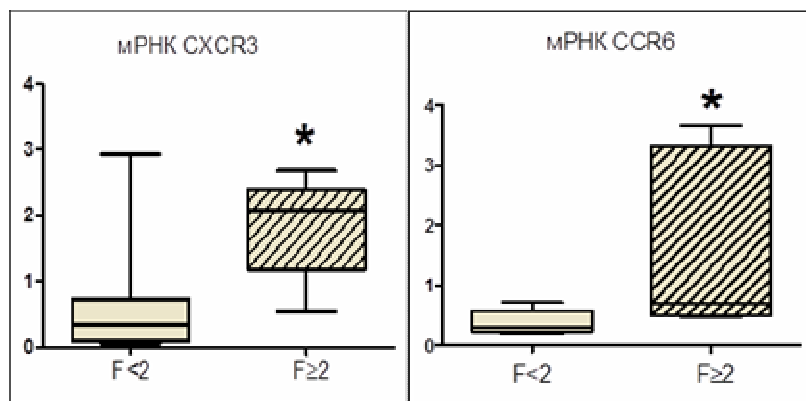


Рисунок 9. Экспрессия мРНК генов рецепторов хемокинов CXCR3 и CCR6 в печени больных ХВГС с различными стадиями фиброза. \*-  $p > 0,05$ .

По мере развития процесса фиброзирования ткани печени значительно возрастал уровень экспрессии мРНК гена CXCL10/IP-10. Это отражает выявленная положительная корреляционная зависимость между внутрипеченочной экспрессией мРНК CXCL10/IP-10 и степенью фиброза печени, что проявляется в нарастании экспрессии мРНК CXCL10/IP-10 в ткани печени по мере развития ХВГС. Содержание мРНК CXCL10/IP-10 в ткани печени являлось наиболее информативным показателем, отражающим скорость прогрессирования фиброза и степень воспаления печени. Следует предположить, что повышение уровня экспрессии мРНК CCR6, CXCR3 и CXCL10/IP-10 в клетках печени, в том числе мигрировавшими в печеночную ткань лимфоцитами, приводит к инфильтрации печени эффекторными клетками, вызывающими повреждение печеночной паренхимы. Исходя из полученных нами данных, можно заключить, что степень повреждения печеночной паренхимы целесообразно оценивать посредством косвенных показателей крови, таких как концентрация хемокинов в плазме крови и выраженность экспрессии рецептора CXCR3 на клетках периферической крови.

Для ВГС характерна высокая степень генетической гетерогенности популяции и наличие множества генотипов и субтипов вируса. Межгенотипная вариабельность первичной нуклеотидной последовательности РНК ВГС может достигать 21-32% от первичной нуклеотидной последовательности. Определение генотипа и субтипа ВГС – важный предиктор как устойчивого вирусологического ответа (УВО) на противовирусную терапию, так и риск развития фиброза/цирроза печени. Генетическая гетерогенность ВГС позволяет вирусу эффективно уклоняться от иммунного ответа хозяина (Dustin L. et al., 2013).

В обследованной нами группе пациентов из Якутии (региона с высокой заболеваемостью парентеральными вирусными гепатитами) были представлены больные только с умеренным и высоким уровнем вирусной нагрузки.

В обследованной выборке наиболее часто встречался генотип 1 (88,3%) по сравнению с генотипами 2 (6,7%) и 3 (3,2%). Среди субтипов 1 генотипа наиболее распространенным был субтип 1b (87,7%). Остальные субтипы этого генотипа найдены в единичных случаях: 1,6% субтип 1a, 6,7% субтип 2a, 3a - 1,6%, 3g - 1,6%.

Согласно данным эпидемиологического анамнеза, диагноз ХВГС был установлен на протяжении большого промежутка времени (ранние изоляты ВГС были идентифицированы в 1992-1995 гг., а поздние - в 2011-2012 годах), т. е. на протяжении почти 20 лет. Несмотря на это, у проанализированных изолятов ВГС была выявлена низкая степень гетерогенности. Отдельные из выявленных изолятов ВГС циркулируют в различных районах Якутии в течение уже нескольких десятилетий по данным филогенетического анализа.

В крови пациентов старше 40 лет (n=22) был идентифицирован ВГС только субтипа 1b. Это совпадает с данными, полученными для близкорасположенного региона Западной Сибири, где ранее было показано значительное (до 75%) преобладание генотипа 1 среди пациентов 51-60 лет (Simmonds P. et al., 2005), с другой стороны, в расположенном западнее Уральском регионе субтип 1b наиболее распространен среди возрастной группы 15-27 лет. Выявленная широкая распространенность субтипа 1b соответствует ранее опубликованным данным о более высокой частоте хронизации, более выраженном поражении печени и повышенном уровне вирусной нагрузки при таком варианте ХВГС, вызванном инфекцией этого субтипа вируса (Blatt L. et al., 2000).

Идентичность нуклеотидной последовательностей выявленных изолятов ВГС субтипа 1b составила  $96,03\% \pm 0,45\%$ . Сравнение отсеквенированных фрагментов с нуклеотидными последовательностями, депонированными в базе данных GenBank, показало высокую степень сходства (до 100%) для проанализированных изолятов из Якутии со штаммами ВГС из США, Бразилии и Ирландии.

Объяснение этого феномена может крыться в сходном характере мутационного процесса гипервариабельной области NS5B. Для ВГС, вообще, характерна высокая частота мутаций, направленных, прежде всего, на ускользание вируса от ответа иммунной системы организма хозяина, либо от действия лекарственных средств ПВТ. Широкая распространенность одинаковых схем ПВТ вызывает преимущество в выживании сходных форм вируса, возникающих в результате параллельных микроэволюционных процессов в разных, иногда значительно удаленных друг от друга частях света. Высказанное ранее предположение L. Zhang и др. (2004) о возможной обусловленности связи между частотой встречаемости различных генотипов ВГС в тех или иных группах населения, в т. ч. в группах высокого риска, и выявленными путями передачи инфекции, но не с географической близостью.

Субтип 2a ВГС был выявлен 6,7% случаев. Обнаруженные изоляты при филогенетическом анализе кластеризуются в две группы с процентом нуклеотидной идентичности между группами  $98 \pm 0,27\%$ , что позволяет предположить общий источник инфекции, несмотря на территориальное деление. Поскольку субтип 2a ВГС встречается на территории Якутии сравнительно редко, был предпринят сравнительный филогенетический анализ для выявления потенциального источника его происхождения. Сравнение NS5B области изолятов РНК ВГС, выделенных от пациентов из Якутии с представленными в международной базе данных GenBank последовательностями РНК ВГС показало тесную филогенетическую связь изолятов из Якутии с изолятами ВГС субтипа 2a, найденными в Китае. Учитывая обширные торгово-экономические отношения Якутии со странами Восточной Азии, вполне вероятен сравнительно недавний завоз этих изолятов.

В обследованной группе меньше всего было выявлено ВГС генотипа 3 (3,2%). В опубликованном Семеновым С. И. с соавт. (2009) материале была ранее показана высокая распространенность именно субтипа 3a ВГС, для которого показана значимая ассоциация с употреблением инъекционных наркотиков. В нашей работе выявлено только два изолята генотипа 3. Поскольку мы исследовали группу больных ХВГС с умеренной и высокой вирусной нагрузкой возрастной группы старше 40 лет, низкая встречаемость генотипа 3 ВГС в данной группе не противоречит вышеизложенным данным. Первичная нуклеотидная последовательность выявленных изолятов ВГС генотипа 3a незначительно отличалась от представленных в базе данных GenBank изолятов, выявленных на территории РФ ранее, и изолятов из других стран (идентичность - 97%).

Особенно интересным нам представляется впервые выявленный на территории РФ ВГС субтип 3g. Максимальный процент идентичности выявленного изолята субтипа 3g составил 97% и 100% с представленными в международной базе данных штаммами от пациентов, иммигрировавших из Пакистана (EF116087.1) и Ливана (JF735123.1), проживающих в Канаде (Рисунок 10).

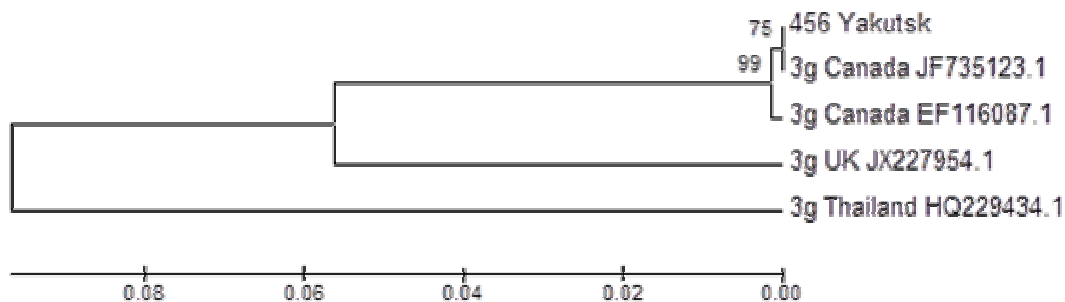


Рисунок 10. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолята ВГС субтипа 3g, выделенного от пациента с ХВГС из Якутска, в сравнении с представленными в международной базе данных Genbank последовательностями максимально идентичных штаммов ВГС из РФ и других стран.

Масштабное скринирование ВГС в Российской Федерации позволило бы оценить пути распространения и время эволюционного разделения изолятов вируса.

Полученные результаты подтверждают необходимость пристального наблюдения отечественных эпидемиологов и инфекционистов за эпидемиологической ситуацией не только в РФ, но и в других странах с учетом ассоциации тех или иных генотипов и субтипов, а также выявленных мутаций с развитием заболевания печени.

## ВЫВОДЫ

1. Иммунологические маркеры отражают интенсивность воспалительного процесса в ткани печени при хронических вирусных гепатитах, причем для различных нозологических единиц информативен их специфический набор, позволяющий оценить степень фиброза печени, что в сочетании с молекулярно-биологическими маркерами способствует уточнению прогноза течения заболевания.

2. Выявление редких для РФ субтипов ВГВ и ВГС, распространенных в иных географических регионах, определяющих тяжелое течение заболевания, достигается с помощью анализа первичной нуклеотидной последовательности и глубокого субтипирования РНК ВГС и ДНК ВГВ.

3. Анализ первичной нуклеотидной последовательности ДНК ВГВ позволил определить субтипы ВГВ при оккультной форме течения ГВ, а также подтвердил гомогенность геновариантов манифестной и оккультной форм течения заболевания, причем спектр характерных субтипов зависит от географического региона, но не от формы течения заболевания.

4. Выявление ккзДНК ВГВ в ткани печени является достоверным маркером оккультного ГВ, а количественная оценка ккзДНК ВГВ в ткани печени позволяет оценить уровень активности течения оккультной формы ХВГВ, что, в свою очередь, дает возможность выявить больных с высокой, умеренной и низкой репликативной активностью вируса.

5. Выявление РНК ВГD у пациентов с активным течением ХВГВ является основным маркером для выявления серонегативного ХВГВ+D.

6. Определение малых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов позволяет проводить оценку степени фиброза печени у больных ХВГС, в том числе на основании корреляции между степенью фиброза печени и количеством В-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновый рецептор CXCR3. Особенно важной представляется возможность достоверного различия умеренного и тяжелого фиброза печени неинвазивным методом.

7. Выявленная взаимосвязь концентрации в плазме периферической крови цитокинов (TNF $\alpha$ , CXCL11/ITAC и CCL20/MIP-3 $\alpha$ ) и уровня экспрессии их мРНК в ткани печени со стадией фиброза, позволила разработать алгоритм для достоверного определения слабой и умеренной стадии фиброза печени специфичный для ХВГС.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Для повышения информативности лабораторной диагностики повреждения ткани печени при хронических вирусных гепатитах, уточнения прогноза заболевания рекомендуется специалистам по клинической лабораторной диагностике, инфекционным болезням, гепатологии, молекулярной эпидемиологии:

1. Для выявления редких субгенотипов ВГС на территории РФ, не выявляемых генотипической ПЦР, рекомендовано применения методов глубокого типирования вируса.

2. Для диагностики оккультного течения ХГВ рекомендуется применять методику выявления ккзДНК ВГВ в ткани печени и в плазме периферической крови. Для уточнения стадии течения ХВГВ рекомендуется количественное определение уровня инфицированности гепатоцитов. Стадия ХВГВ умеренной активности характеризуется поражённостью ткани печени от 0,3 до 2 копий ккзДНК на гепатоцит, в то время как у неактивных носителей HBsAg соотношение инфицированных и неинфицированных клеток печени менее чем 0,3 копии ккзДНК на клетку

3. Для выявления серонегативного варианта течения ХГВ+D, особенно у пациентов с активным течением ХГВ (в случае АЛТ>2N на протяжении 6 месяцев и более, HBsAg(+), HBcorIgG(+), HCV IgG+IgM (-)), рекомендуется широкое применение определения РНК ВГD. При применении наборов для определения РНК ВГD методом ПЦР в плазме крови, для повышения чувствительности метода следует применять экстракцию ДНК/РНК из 1 мл плазмы, либо предварительно концентрировать вирус ультрацентрифугированием.

4. Для оценки стадии фиброза при хроническом вирусном гепатите С рекомендуется одновременное определение в сыворотке периферической крови TNF $\alpha$ , CXCL11/ITAC и CCL20/MIP-3 $\alpha$ . Применение разработанного алгоритма постаналитической обработки результатов мультиплексного анализа позволяет эффективно разделять стадии фиброза. Рекомендованы следующие пороговые значения: для дифференцирования стадий фиброза F0-1 и F2: CXCL11/ITAC - 166,5 пг/мл, TNF $\alpha$  - 15,7 пг/мл, CCL20/MIP-3 $\alpha$  - 10,6 пг/мл; для дифференциальной диагностики стадий фиброза F2 и F3-4: TNF $\alpha$  - 15,8 пг/мл, CXCL11/ITAC - 301,8 пг/мл, CCL20/MIP-3 $\alpha$  - 15,5 пг/мл.

## **ПЕРСПЕКТИВА ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

В качестве перспектив дальнейшей разработки проблемы планируется дальнейший поиск неинвазивных биомаркеров воспаления ткани печени при ХВГВ, ХВГВ+D, изучение провоспалительных хемокинов и цитокинов, а также их рецепторов с целью уточнения прогноза развития заболеваний печени при хронических вирусных гепатитах; разработка и совершенствование методов выявления ккзДНК ВГВ для лабораторной диагностики окГВ, поиск биомаркеров реактивации окГВ и его перехода в манифестную форму ХВГВ.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий

1. **Семенов, А. В.** Предварительные итоги лабораторной диагностики вирусных гепатитов В и С в рамках приоритетной национальной программы «Здоровье» в Санкт-Петербурге / А. В. Семенов, С. С. Вашукова, А. Г. Рахманова // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2010. – № 3 – С. 61-64.
2. **Семенов, А. В.** Встречаемость латентного (HBsAg-негативного) хронического гепатита В среди пациентов кабинетов инфекционных заболеваний поликлиник Санкт-Петербурга / А. В. Семенов, С. С. Вашукова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. - № 3. – С. 90-94.
3. **Семенов, А. В.** Распространенность серонегативного гепатита D среди пациентов с хроническим вирусным гепатитом В / А. В. Семенов // ЖМЭИ. – 2012. - № 6. – С. 106-109.
4. Арсентьева, Н. А. Роль полиморфизма генов цитокинов при вирусном гепатите С / Н. А. Арсентьева, **А. В. Семенов**, Арег А. Тотолян // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2. - № 4. – С. 687-698.
5. **Семенов, А. В.** Интерпретация результатов выявления маркеров вирусного гепатита В / А. В. Семенов // Справочник зав. КДЛ. - 2012. - № 11. - С.26-37
6. **Семенов, А. В.** Особенности популяционного состава CXCR3-положительных лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С / А. В. Семенов, Н. А. Арсентьева, Д. С. Елезов и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - № 6. - С.69-75
7. Арсентьева, Н. А., Экспрессия хемокинового рецептора CXCR3 на субпопуляциях В-лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С / Н. А. Арсентьева, И. В. Кудрявцев, Д. С. Елезов, **А. В. Семенов** и др. // Мед. Иммунол. – 2013. - № 6.- С.69-75
8. Елезов, Д. С. Анализ субпопуляций Т-хелперов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и активационные маркеры CD38 и HLA-DR / Д.С. Елезов, И.В. Кудрявцев, Н.А. Арсентьева, **А. В. Семенов** и др. // Инфекция и иммунитет – 2013. - Т. 3, № 4,- С. 327–334
9. **Семенов, А. В.** Количественное определение HBsAg в сыворотке крови и кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В в ткани печени как маркеры активности хронического вирусного гепатита В / А. В. Семенов, И. А. Власова, Ю. В. Останкова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. - N 1.- С. 55-61
10. Арсентьева, Н. А. Содержание цитокинов и хемокинов в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом С / Н. А. Арсентьева, **А. В. Семёнов**, Н. Е. Любимова и др. // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 1. – С. 83-92
11. Останкова, Ю. В. К вопросу о молекулярной эпидемиологии гепатита D в Кыргызстане / Ю. В. Останкова, К. А. Ногойбаева, **А. В. Семенов** и др. // Медицинский академический журнал. – 2015. – Т. 15, № 2 - С. 73-78
12. Белопольская, М. А., Эффективность назначения телбивудина в третьем триместре беременности для предупреждения вертикальной передачи вирусного гепатита В / М. А. Белопольская, С. Л. Фирсов, Ю. В. Останкова, **А. В. Семенов** и др. // Журнал инфектологии. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 105-107
13. Арсентьева, Н. А. Хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и их лиганды в печени и крови больных хроническим вирусным гепатитом С / Н. А. Арсентьева, **А. В. Семенов**, Н. Е. Любимова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 8. – С. 218-222
14. Елезов, Д.С. Хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6, в периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С / Д. С. Елезов, И.В. Кудрявцев, Н.А. Арсентьева, **А.**

**В. Семенов** и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 8. – С. 204-208

15. **Семенов, А. В.** Роль цитокинов и хемокинов в лабораторной диагностике хронического вирусного гепатита С / А. В. Семенов, Н. А. Арсентьева, Н. Е. Любимова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60, № 8. – С. 45-51

16. **Семенов, А. В.** Молекулярно-эпидемиологические особенности изолятов вируса гепатита С из разных регионов Республики Саха (Якутия) / А. В. Семенов, Ю.В. Останкова, В.В. Герасимова и др. // Инфекция и иммунитет. – 2015. - Т. 5, № 4. - С. 359–372

17. Останкова, Ю.В. Распространенность молекулярно-биологических маркеров вируса гепатита в среди вич-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ в Великом Новгороде/ Ю.В. Останкова, **А.В. Семенов**, М.А. Чурина, А.А. Тотолян//ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. - 2016. - Т.8. - № 4. - С. 89-90.

18. **Семенов, А. В.** К вопросу о молекулярной эпидемиологии гепатита В в Республике Саха (Якутия) / А. В. Семенов, Ю. В. Останкова, В. В. Герасимова и др. // Журнал инфектологии. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 57-65

19. **Семенов, А. В.** Особенности молекулярной эпидемиологии сочетанной инфекции ВГВ/ВГД в Кыргызстане / А. В. Семенов, Ю. В. Останкова, К. А. Ногойбаева и др. // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т.6, №2 – С.141-150

20. Останкова, Ю. В. Молекулярно-биологические маркеры гепатита В у пациентов с фиброзом/циррозом печени в Узбекистане / Ю. В. Останкова, **А. В. Семенов**, Х. Н. Файзуллаев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2016. – № 5. - С. 34-43

21. **Семенов, А. В.** Кольцевая ковалентно замкнутая ДНК ВГВ как маркер распространенности острого гепатита В у пациентов с ВГВ, ВГД и ВГС инфекцией в Узбекистане / А. В. Семенов, Ю. В. Останкова, Х. Н. Файзуллаев и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2016. – № 5. - С. 43-49

22. Останкова, Ю. В. Генетические варианты вируса гепатита В у первичных доноров в г. Астана, Казахстан / Ю. В. Останкова, **А. В. Семенов**, Ж. К. Буркитбаев и др. // Инфекция и иммунитет. - 2016. - Т. 6, № 4. - С. 359–366.

23. Чурина М.А. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ-1 у пациентов с неэффективностью АРВТ в Великом Новгороде/ М.А.Чурина, Ю.В. Останкова, **А.В. Семенов**, Никитина Н.А. и др.// ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. - 2017. - Т.9. - № 1. - С. 82-92.

### **Монографии**

24. Семенов, А. В. Вирусологические исследования. Молекулярно-биологические методы// Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство; в 2 т. / А. В. Семенов, Л. Б. Гончарова / под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова. – М: ГЭОТАР-Медиа. - 2012. – Т. 2. – С. 613-627.

### **Статьи, тезисы докладов и статей, научные издания, методические руководства**

25. Мукомолов, С. Л. Молекулярная эпидемиология вирусных гепатитов: пособие для врачей / С. Л. Мукомолов, Н. В. Железнова, Г. В. Трифонова, А. В. Семенов /под ред. А. Б. Жебруна. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. – 28 с.

26. Эсауленко, Е. В. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. Том 10 / Е. В. Эсауленко, Л. В. Лялина, Г. Ф. Трифонова, А. В. Семенов, А. А. Сухорук, А. В. Сталевская, Д. Д. Болсун, Е. В. Харьковская, М. В. Алексеева, Е. В. Личная, С. Л. Плавинский, В. П. Чуланов, Н. Н. Пименов, С. В. Комарова / под ред. В. И. Покровского, А. А. Тотоляна. Санкт-Петербург: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2016 – 152 с.

27.. Арсентьева, Н. А. Уровень содержания цитокинов и хемокинов в плазме больных хроническим вирусным гепатитом С / Н. А. Арсентьева, А. В. Семёнов, В. В. Басина и др. // Юбилейная научно-практическая конференция «Современные проблемы иммунофармакологии, биотехнологии и цитокиновой регуляции», посвящённая 40-летию ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России: Материалы.- Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 87.

28. Останкова, Ю. В. Молекулярно-эпидемиологические особенности вируса гепатита В (ВГВ) в республике Якутия / Ю. В. Останкова, А. В. Семенов, С. Л. Мукомолов и др. // VI Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины»: Материалы – Ставрополь. - 2014. – С.59.

29. Arsentyeva, N. Plasma cytokines and chemokines levels in patients with chronic hepatitis C / N. Arsentyeva, A. Semenov, V. Basina et al // Institute Pasteur International Network. Paving the way for Research on Global Health and One Health. Paris, September 10-13, 2014. - Paris. – 2014. – P. 94.

30. Ostankova, Y. Molecular epidemiology of HBV in the Republic of Yakutia / Y. Ostankova, A. Semenov, S. Mukomolov et al // Institute Pasteur International Network. Paving the way for Research on Global Health and One Health. Paris, September 10-13, 2014. – Paris. – 2014. – P. 101

31. Семенов, А. В. Молекулярная эпидемиология гепатита D в Кыргызстане / А. В. Семенов, Ю. В. Останкова, А.А Тотолян и др. // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: Материалы международной конференции / Под ред. докт. мед. наук, профессора А. Ю. Поповой, академика РАН, докт. мед. наук, профессора В.В. Кутырева. – Москва, 2015. – С. 345-346

32. Арсентьева, Н. А. Цитокины/хемокины в диагностике фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С / Н. А. Арсентьева, А. В. Семёнов, А. А. Тотолян // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены. VII Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора: Материалы. – СПб. – 2015. – С. 89-91

33. Семенов. А. В. Экспрессия хемокинового рецептора CXCR3 на лимфоцитах крови больных, инфицированных ВИЧ и вирусом гепатита С / А. В. Семенов, Н.А. Арсентьева, А. А. Тотолян // 5 конференция по вопросам ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии: тезисы. – 2016. – С. 26-27.

34. Арсентьева, Н. А. Цитокины/хемокины, как иммунологические биомаркеры хронического вирусного гепатита С / Н. А. Арсентьева, Н. Е. Любимова, А. В. Семенов и др. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, специальный выпуск. – С. 145

35. Елезов, Д. С. Анализ субпопуляций Т-регуляторных клеток периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С / Д. С. Елезов, Н. А. Арсентьева, И. В. Кудрявцев и др. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, специальный выпуск. – С. 147

36. Semenov, A. Plasma cytokines and chemokines levels as biomarkers of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients / A. Semenov, N. Arsentieva, O. Batsunov et al // Institute Pasteur International Network Scientific Symposium, Paris, 29 November - 2 December, 2016. – Paris. – 2016. - P. 63.

37. Semenov, A. HBV markers amongst Russian HIV-infected patients and blood donors from Central Asia / A. Semenov, Y. Ostankova, E. Musabaev et al // Institute Pasteur International Network Scientific Symposium, Paris, 29 November - 2 December, 2016. – Paris. – 2016. - P. 64

38. Басина, В. В. Содержание малых субпопуляций лимфоцитов у пациентов, получивших противовирусную терапию при хроническом гепатите С / В.В. Басина, Н.А. Арсентьева, А.В. Семенов и др. // IV конгресс Евро-азиатского общества по инфекционным болезням. Санкт-Петербург, 18-20 мая, 2016: Материалы. - Журнал инфектологии. – 2016. – Т. 8, № 2. – С. 21.

39. Gabdrakhmanov I. Relationship between HBsAg, HBV DNA, covalently closed circular DNA and fibrosis stage in chronic HBV (HBeAg-negative) patients / I. Gabdrakhmanov, K. Zhdanov, K. Kozlov, A. Semenov, V. Sukachev, J. Ostankova, A. Gvozdetskiy, S. Zhabrov, E. Kudelka// Journal of Hepatology. – 2017. – Vol. 66, Suppl. 1. – S.487.

40. Эсауленко Е.В. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика острого гепатита В в Северо-западном федеральном округе/ Е. В.Эсауленко, М. В. Понятишина, М. В. Алексеева, А. В. Семенов, Ю. В. Останкова, Н. В. Иванова // Материалы IX Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – 2017. С. 329.

## Список используемых сокращений

АИГ – аутоиммунный гепатит	IL - интерлейкин
АЛТ – аланинаминотрансфераза	IFN – интерферон
АСТ – аспартатаминотрансфераза	NF-κβ – нуклеарный фактор транскрипции NF-каппа-β
ВГ – вирусный гепатит	NK – натуральные (естественные) киллеры
ВГВ – вирус гепатита В	NKT – натуральные (естественные) киллеры Т-лимфоциты
ВГD – вирус гепатита D	ROC-кривая – кривая операционной характеристики
ВГЕ – вирус гепатита E	TGFβ – трансформирующий ростовой фактор β
ВГС – вирус гепатита С	TLR – толл-подобный рецептор
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека	TNFα – фактор некроза опухоли α
ГВ – гепатит В	Treg – Т-регуляторные клетки
ГГТП – гаммаглутамилтранспептидаза	
ГС – гепатит С	
ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома	
ДК – дендритная клетка	
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	
дцРНК – двухцепочечная РНК	
ИФА – иммуноферментный анализ	
КИЗ – кабинет инфекционных заболеваний	
кДНК – комплементарная ДНК	
ккзДНК – кольцевая ковалентно-замкнутая ДНК	
МКА – моноклональные антитела	
МНО – международное нормализованное отношение	
мРНК – матричная РНК	
НК – нуклеиновая кислота	
ОГВ – острый гепатит В	
ОГD – острый гепатит D	
ОГС – острый гепатит С	
ОкГВ – оккультный (HBsAg-негативный) гепатит В	
ОПУ – отрицательный предсказательный уровень	
ОФД - ортофенилендиамин	
ПБЦ – первичный билиарный цирроз	
ПВТ – противовирусная терапия	
ПЕГ-ИФН – пегилированный интерферон α	
ППК – площадь под кривой	
ППУ – положительный предсказательный уровень	
ПЦР – полимеразная цепная реакция	
РНК – рибонуклеиновая кислота	
Tm – температура плавления праймера	
УВО – устойчивый вирусологический ответ	
УЗИ – ультразвуковое исследование	
ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с твином	
ХВГ – хронический вирусный гепатит	
ХВГВ – хронический вирусный гепатит В	
ХВГВ+D– хронический вирусный гепатит В+D	
ХВГС – хронический вирусный гепатит С	
ХГ – хронический гепатит	
ЦМВ – цитомегаловирус	
ЦФР – цитратно-фосфатный буферный раствор	
ЭБВ – вирус Эпштейна-Барр	
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота	
CD – кластер дифференциации	
GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа)	