



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

КВАНТИФИКАЦИЈА И ЛОКАЛИЗАЦИЈА FOXP3+ Т ЛИМФОЦИТА И ПОВЕЗАНОСТ СА СТЕПЕНОМ ИНФЛАМАЦИЈЕ ТОКОМ ХРОНИЧНЕ HCV ИНФЕКЦИЈЕ

Кључне речи :

HCV, хепатитис, FoxP3, Т лимфоцити, цитокини

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Имунски систем има развијене механизме одржавања хомеостазе, региструје сваку промену која нарушава равнотежно стање и тежи да то стање поврати. Кључну улогу у процесима регулације и модулације имунских одговора имају Т регулаторни лимфоцити, (Treg). Мада се одавно указивало на то да посебна ћелијска популација има улогу у контроли аутоимунских процеса, тек је *Sakaguchi* 1995. године описао Treg као посебан субсет периферних CD4+ Т лимфоцита који коекспримира CD25 молекула (α -ланац рецептора за IL-2, IL-2R) и има кључну улогу у контроли аутореактивних Т лимфоцита. Т регулаторни лимфоцити имају веома значајне улоге: контрола инфламаторних процеса, превенција аутоимунских процеса, одржавање имунолошке толеранције на бактерије нормално присутне на мукозама, па је правилно функционисање Treg ћелија веома важно за спречавање настајања патолошких стања. Treg ћелије утичу директно на имунске одговоре на разне микроорганизме (*Candida albicans*, *Leishmania major*, *Schistosoma masoni*, cytomegalovirus и hepatitis C virus), често могу да узрокује хроничне инфекције, али смањењем инфламације се избегавају велика оштећења ткива. Да ли ће утицај Treg ћелија у инфекцији да буде повољан или ће лоше да утиче на организам зависи од низа других фактора, ГНК хаплотипа, врсте микроорганизма, обима иницијалног инфламаторног процеса. Супресија коју изазивају Treg индуковане HCV вирусом може да снизи имунске одговоре Т ћелија у раним фазама инфекције и тако онемогуће отклањање вируса али и смањују запаљенски инфилтрат у јетри и превенирају масовна оштећења ткива и појаву аутоимунских болести јетре.

Циљ истраживања

Одредити фреквенцију и фенотип CD4/CD25/Foxp3+ (Treg), CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцита у јетри и периферној крви пацијената са хроничном HCV инфекцијом, испитати цитокински профил (Th1, Th2, Th17) имунског одговора у хроничној HCV инфекцији као и постојање евентуалне повезаности ових параметара, вирусне репликације и нивоа оштећења јетриног паренхима

Актуелност истраживања

Претпоставља се да око 170 милиона људи широм света, има хроничну хепатитис С вирусну (HCV) инфекцију. Међутим, ова инфекција је доказана само код 25% инфицираних јер су симптоми болести, или одсутни, или некарактеристични, те се открива најчешће случајно



приликом рутинског тестирања крви. Генотип HCV показује велику хетерогеност, што се тумачи великим бројем грешака у процесу транскрипције и недостатком репарационих механизма (1,2). Вирус је доказан у готово свим телесним течностима, ипак, најчешћи пут преноса је *парентерални*, тј, *путем крви и деривата крви* (1). Акутна HCV инфекције најчешће протиче као *асимптоматска болест*, знатно ретко (15-20%) као *манифестна болести* (иктерична форма), а изузетно ретко као *фулминантни хепатитис* са хепатоцелулараном инсуфицијенцијом. Међутим, после акутног хепатитиса већина болесника (55 - 85%) не успева да елиминише вирус, те развијају доживотну, хроничну HCV инфекцију. Најзначајнију дијагностичку вредност имају повишене активности *серумских аминотрансфераза (AST/ALT)* (3,4). Оне уједно, код болесника са хроничном ХЦВ инфекцијом често флукутирају у времену праћења. Детекција *анти - HCV антитета* у серуму је најпрактичнији начин за доказивање прележане или актуелне HCV инфекције; користе се комерцијални имуносорбент тест (ELISA) и рекомбинантни имуноблот тест (RIBA). Вируслошка метода се најчешће користи у детекцији вирусне репликације (HCV RНК) (PCR техника). У циљу постављања егзактне дијагнозе **HCV** неопходна је биопсија јетре. Хистопатолошки налаз омогућава потврду клиничке дијагнозе, али и одређивање нумеричког степена некроинфламаторне активности (градинг) и степена фиброзе (стагинг) што, са великом вероватноћом, указује на даљу еволуцију болести (1,2,5,6,7). Имуноски систем има развијене механизме одржавања хомеостазе, региструје сваку промену која нарушава равнотежно стање и тежи да то стање поврати. Кључну улогу у процесима регулације и модулације имунских одговора имају Т регулаторни лимфоцити, Treg (10,11). Treg представља посебан субсет периферних CD4+ Т лимфоцита који коекспримира CD25 молекула (α -ланац рецептора за IL-2, IL-2R) и има кључну улогу у контроли аутореактивних Т лимфоцита. За настајање Treg фенотипа неопходне су интеракције високог афинитета између G_HК класе II и аутоантигена, али се сматра да је потребно и континуирано присуство тог антигена у високој концентрацији. За развој и опстанак Treg ћелија неопходно присуство IL-2, TGF β , сигнали са CD28, CTLA-4, CD40 и, а најзначајније је присуство FoxP3 молекула. FoxP3 је транскрипциони фактор који припада forkhead фамилији (11). Супресивна активност Treg ћелија се карактерише инхибицијом пролиферације циљне ћелије. Кад се једном активирају Treg ћелије одржавају своју активност без обзира на антигену специфичност циљних ћелија Treg ћелије утичу директно на имунске одговоре на разне микроорганизме (*Candida albicans*, *Leishmania major*, *Schistosoma masoni*, *Cytomegalovirus* и *Hepatitis C virus*), супресивно дејство ових ћелија може бити узрок хроничне инфекције, али истовремено смањењем инфламације се избегава велико оштећење ткива. Да ли ће утицај Treg ћелија у инфекцији да буде повољан или ће лоше да утиче на организам зависи од низа других фактора, G_HК хаплотипа, врсте микроорганизма, обима иницијалног инфламаторног процеса. Супресија коју изазивају Treg индуковане HCV вирусом може да снизи имунске одговоре Т ћелија у раним фазама инфекције и тако онемогуће отклањање вируса али и смањују запаљенски инфилтрат у јетри и превенирају масовна оштећења ткива и појаву аутоимунских болести јетре (10,11).

Предмет и опис истраживања: задаци, методологија, очекивани резултати

А. Задаци истраживања:

1. Утврдити присуство CD4/CD25/Foxp3+, CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцита и макрофага у јетри и периферној крви пацијената са хроничном HCV инфекцијом и контролној групи.
2. Одредити број CD4/CD25/Foxp3+ у јетри и периферној крви и резултат приказати као проценат CD4/CD25/Foxp3+ у односу на укупне CD4 лимфоците.
3. Утврдити ниво експресије рецептора програмиране смрти-1 (PD-1 од енгл. programmed death 1 receptor) и фосфорилације STAT-5 у CD4/CD25/Foxp3+ лимфоцитима



4. Утврдити повезаност броја CD4/CD25/Foxp3+, CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцита и макрофага у јетри и периферној крви са степеном инфламације (градус) и фиброзе (стадијум) јетриног паренхима.
5. Утврдити повезаност броја CD4/CD25/Foxp3+, CD4+, CD8+, CD20+ лимфоцита и макрофага у јетри и периферној крви са бројем HCV RНК копија и серумским нивоом ALT и AST.
6. Испитати профил секретованих цитокина (Th1, Th2, Th17) у периферној крви испитаника.
7. *Ex vivo* утврдити профил секретованих цитокина (Th1, Th2, Th17) у 24h култури мононуклеарних леукоцита периферне крви испитаника.

Б. Пацијенти.

У истраживање ће бити укључени пацијенти са хроничном HCV инфекцијом. Ретроспективну групу чиниће 40 пацијената са хроничном HCV инфекцијом који су у периоду 2003-2009 лечени на инфективној клиници КЦ у Крагујевцу. Проспективну групу чиниће 24 пацијента са хроничном HCV инфекцијом и 24 здрава испитаника.

Ц. Методологија.

Општи протокол: За имунохистохемијску анализу користиће се ткивни узорци јетре фиксирани 5% пуферисаним неутралним формалином, дехидрисани, просветљени, прожети парафином и укалупљени у парафин. Здравим испитаницима и пацијентима из проспективне групе испитаника ће се узимати 10мл хепаринизоване периферне крви, а мононуклеарни леукоцити ће се добијати из венске крви помоћу густинског градијента (Lymphoprep 1.077). Мононуклеарни леукоцити и узорци плазме ће се чувати на -70°C до извођења есеја.

Лабораторијска дијагноза хроничне HCV инфекције, код испитаника ретроспективне групе, је потврђена одређивањем присуства и броја HCV RНК копија у периферној крви испитаника применом **PCR** технике. Истом методом ће се поставити дијагноза и код пацијената из проспективне групе.

Серумске концентрације ALT и AST су код пацијената из ретроспективне групе одређене стандардним **биохемијским тестовима**.

Серумска концентрација цитокина (Th1, Th2, Th17) у периферној крви испитаника, као и *ex vivo* продукција цитокина (Th1, Th2, Th17) у 24h култури мононуклеарних леукоцита периферне крви испитаника ће се одредити ЕЛИСА методом.

Фенотипизација Т регулаторних ћелија (CD4/CD25/Foxp3) у ткиву јетре и периферној крви ће се одредити **методама имунохистохемије и проточне цитометрије**. Присуство и фенотип Treg у биоптатима јетре ће се одредити методом имунохистохемије. Присуство и фенотип Treg у периферној крви ће се одредити методом проточне цитометрије.

Степен инфламације (градус) и фиброзе (стадијум) јетриног паренхима ће се одредити стандардним **патохистолошким методама** (хематоксилин-еозин (ХЕ) методом). Градирање перипорталне некрозе (0-10), интралобуларне некрозе (0-4) и порталне инфламације (0-4) даје сумарно градус или инфламаторни индекс (0-18). Степен фиброзе (0-4) даје стадијум или индекс фиброзе. Укупни ИФ скор се добија сабирањем вредности градуса и стадијума (0-22).

Статистичка обрада: Величину узорка ретроспективне групе испитаника није било могуће израчунати обзиром да су подаци о учесталости и фенотипу Treg у биоптатима јетре пацијената са хроничном HCV инфекцијом непознати, тј. неколико студија које су се бавиле овом проблематиком пружају податке који нису компарабилни обзиром на то да су у њима коришћене различите технике и методе идентификације Т регулаторних лимфоцита. Величина узорка проспективне групе испитаника је израчуната на основу података о вредностима концентрације ALT, IL-4 и IL-10, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за т-тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак (IL-10:24, IL-4:10, ALT:<10), утврђен је дефинивни број испитаника према групама и он износи 24 (**укупан узорак од 48**). Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (т-тестом за два независна узорка или



Mann-Whitney U тестом) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 85\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет СПСС.

Очекивани резултати:

Анализирајући податке из литературе који се односе на истраживања у области регулације и модулације имунских одговора код пацијената са HCV и клиничких студија у којима је испитиван имунски одговор, можемо претпоставити да ће код пацијената са потврђеном HCV инфекцијом број и фенотип CD4/CD25/Foxp3 лимфоцита у јетри бити већи него у периферној крви, као и већи у односу на податке из контролне групе (здраве особе). Очекујемо да ће проценат CD4/CD25/Foxp3 лимфоцита као проценат укупних CD4 лимфоцита бити већи у јетри него у периферној крви, као и већи у односу на податке из контролне групе. Такође очекујемо и да је степен диференцијације и активације CD4/CD25/Foxp3 у јетри обрнуто сразмеран са степеном инфламације и фиброзе јетриног паренхима.

Значај истраживања

Хронични хепатитис С је дуготрајна болест јетре која може прогредирати у цирозу јетре са тешким последицама. Процењује се да ће ова тиха и подмукла пандемија резултирати максималним бројем инфицираних тек негде око 2020. године. Кључну улогу у процесима регулације имунског одговора имају Treg лимфоцити чија се супресивна активност карактерише инхибицијом пролиферације ефекторних лимфоцита. Обзиром на функцију Treg и њихов значај у превенцији масивног оштећења ткива јетре, једна од идеја које се намећу је и да модулација Treg функције може бити једна од терапијских стратегија за лечење хроничне HCV.

Временски оквир

Сходно величини студијског узорка (здрави испитаници 24, пацијенти са хроничном HCV инфекцијом) и броју пацијената са хроничном HCV инфекцијом који се на годишњем нивоу дијагностикују на инфективном одељењу КЦ у Крагујевцу, предвиђено је да ова студија траје 12 месеци.

Литература

1. Alter, M.J. (2002) Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*, 36(5 Suppl 1): S93-8
2. Bacon, B.R., Mchutchison, J.G. (2007) Into the light: Strategies for battling hepatitis C. *Am J Manag Care*, 13 Suppl 12: S319-26
3. Chen TY, Hsieh YS, Wu TT, Yang SF, Wu CJ, Tsay GJ, Chiou HL. Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection. *Transl Res*. 2007 Aug;150(2):116-21. Epub 2007 May 23.
4. Akyüz F, Polat N, Kaymakoglu S, Aksoy N, Demir K, Beşişik F, Badur S, CakalogluY, Okten A. Intrahepatic and peripheral T-cell responses in genotype 1b hepatitis C virus-infected patients with persistently normal and elevated aminotransferase levels. *World J Gastroenterol*. 2005 Dec 7;11(45):7188-91.
5. Buckton, A.J., Ngui, S.L., Arnold, C., i dr. (2006) Multitypic Hepatitis C virus infection identified by real-time nucleotide sequencing of minority genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8): 2779
6. Hwang, S.Y., Lee, H.J., Park, K.T., i dr. (2007) Effectiveness and complications of combination therapy with interferon alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Korean J Gastroenterol*, 49,(3),166-72



7. Ayaz, C., Celen, M.K., Yuce, U.N., Geyik, M.F. (2008) Efficacy and safety of pegylated-interferon a-2a in hemodialysis patients with chronic hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology*, 14(2): 255
8. Bedossa, P., Poynard, T. (1996) An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*, 24(2): 289-9
9. 9.Dokić Ljubiša, Švirtlih Neda, Boričić Ivan V., Božić Milena, Popović Nataša, Bojović Ksenija Milošević Ivana, Ristović Maja, Damjanović Olja. *Acta infectologica Iugoslavica*, vol. 8, br. 1, str. 35-40, 2003
10. Cerny, A., Chisari, F.V. (1999) Pathogenesis of chronic hepatitis C: Immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology*, 30(3): 595-601
11. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, and Shiv Pillai. (2007)-6th ed. *Cellular and Molecular Immunology*.