

Anna Pauli

*Korelacje pomiędzy fenotypem i funkcją komórek NK a stanem klinicznym  
u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C*

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Promotor: Prof. zw. dr hab. n. med. Iwona Mozer – Lisewska

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. zw. dr hab. n. med. Iwona Mozer – Lisewska

Praca finansowana z grantu nr NN401535740

z Narodowego Centrum Nauki

Kierownik badań: Prof. zw. dr hab. n. med. Iwona Mozer – Lisewska

Poznań 2014

*Pragnę serdecznie podziękować*

*mojemu Promotorowi*

*Pani Prof. zw. dr hab. n. med. Iwonie Mozer-Lisewskiej*

*za pomysł, możliwości, wsparcie*

*i stałą inspirację w czasie realizacji pracy*

*oraz*

*Panu Prof. zw. dr hab. n. med. Janowi Żeromskiemu*

*za okazaną pomoc, udostępnienie warsztatu badawczego i cenne uwagi*

*Panu dr n. biol. Mariuszowi Kaczmarkowi z Katedry Immunologii Klinicznej*

*za wprowadzenie w skomplikowane arkana cytometrii przepływowej*

*a wszystkim Współpracownikom*

*z Katedry i Kliniki Chorób Zakaźnych*

*Za całokształt życzliwości*

*Pracę dedykuję mojej Rodzinie*

## Spis treści

1.	Wykaz skrótów użytych w pracy.....	5
2.	Wstęp .....	7
2.1.	Wirus zapalenia wątroby typu C .....	8
2.1.1.	Genom wirusa, budowa wirusa .....	9
2.1.2.	Cykl replikacyjny wirusa HCV .....	11
2.2.	Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C (PZWC).....	14
2.2.1.	Epidemiologia .....	14
2.2.2.	Drogi przenoszenia .....	15
2.2.3.	Obraz kliniczny. Przebieg zakażenia .....	16
2.2.4.	Powikłania.....	18
2.2.5.	Diagnostyka .....	19
2.2.6.	Leczenie .....	21
2.2.6.1.	Wskazania do leczenia.....	21
2.2.6.2.	Leki.....	21
2.2.6.3.	Schematy leczenia .....	23
2.2.7.	Ocena leczenia i rokowanie .....	23
2.3.	Immunopatogeneza zakażenia HCV.....	26
2.3.1.	Charakterystyka odpowiedzi wrodzonej.....	26
2.3.1.1.	Elementy składowe odpowiedzi wrodzonej .....	26
2.3.1.2.	Receptory odpowiedzi wrodzonej .....	28
2.3.1.3.	Komórki NK.....	29
2.3.1.3.1.	Mechanizm działania komórek NK i ich receptory .....	30
2.3.1.3.2.	Aktywacja komórek NK .....	34
2.3.2.	Metody oceny immunofenotypu komórek biorących udział w reakcjach immunologicznych, w tym komórek NK.....	34
2.4.	Interakcje wirusa HCV z komórkami odpowiedzi wrodzonej gospodarza .....	36
2.4.1.	Faza zakażenia, obrona przed zakażeniem.....	37
2.4.2.	Ostre zapalenie wątroby typu C .....	38
2.4.3.	Zakażenie przewlekłe HCV .....	39
2.4.3.1.	Rola komórek NK.....	39
2.4.3.2.	Rola wirusa HCV .....	40
2.4.4.	Zmiany histopatologiczne a immunologia .....	41
2.4.4.1.	Skład nacieku zapalnego.....	41

2.4.4.2.	Włóknienie wątroby.....	42
2.4.5.	Wpływ leczenia na procesy immunologiczne .....	43
3.	Cel pracy .....	46
4.	Pacjenci, materiał i metody .....	47
4.1.	Pacjenci .....	47
4.2.	Materiał i metody .....	48
4.2.1.	Badania laboratoryjne .....	48
4.2.2.	Metoda cytofluorymetrii przepływowej.....	49
4.3.	Analiza statystyczna .....	51
5.	Wyniki .....	52
5.1.	Charakterystyka grupy badanej .....	52
5.1.1.	Wiek i płeć badanych.....	52
5.1.2.	Dane dotyczące genotypu wirusa i wiremii .....	53
5.1.3.	Badania laboratoryjne .....	54
5.1.4.	Badanie patomorfologiczne .....	56
5.2.	Analiza immunofenotypu komórek NK krwi obwodowej u pacjentów z grupy badanej .....	56
5.2.2.	Porównanie cytometrii względem danych klinicznych w grupie chorych.....	65
5.2.2.1.	Korelacje wieku pacjentów z wynikami cytometrii .....	65
5.2.2.2.	Korelacje wyników biochemicznych i AFP z wynikami cytometrii .....	67
5.2.2.3.	Porównanie wyników cytometrii w grupach w zależności od aktywności aminotransferaz.....	69
5.2.2.4.	Porównanie zależności pomiędzy ekspresją receptorów komórek NK .....	69
5.2.2.5.	Porównanie wyników cytometrii w grupie z wysoką wiremią vs. cała grupa HCV+ .....	70
5.2.2.6.	Porównanie wyników cytometrii w grupie z niską i wysoką wiremią.....	71
5.2.2.7.	Korelacje stanu wątroby z wynikami cytometrii .....	71
5.2.2.8.	Porównanie wyników cytometrii z uwzględnieniem chorób współistniejących .....	73
5.2.2.9.	Porównanie wyników cytometrii w grupach z uwzględnieniem nadciśnienia tętniczego .....	77
5.2.2.10.	Porównanie wyników cytometrii w grupach w zależności od czasu ekspozycji na HCV .....	78
5.2.2.11.	Porównanie wyników cytometrii w grupach zaawansowania zapalenia wątroby .....	79
6.	Omówienie wyników i dyskusja .....	80
7.	Wnioski .....	88
8.	Streszczenie.....	89
9.	<i>Summary</i> .....	91
10.	Piśmiennictwo .....	93
11.	Spis rycin i tabel .....	99

## 1. Wykaz skrótów użytych w pracy

AFP-  $\alpha$ -fetoproteina

ALT- Aminotransferaza alaninowa (ang. *alanine aminotransferase*)

APC - Komórki prezentujące antygen (ang. *antigen presenting cell*)

AST – Aminotransferaza asparaginowa (ang. *asparagin aminotransferase*)

CD- Antygen różnicowania komórkowego (ang. *cluster of differentiation*)

DAA – Bezpośrednio działające leki przeciwwirusowe (ang. *direct-acting antivirals*)

DC - Komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cell*)

E1- Glikoproteina otoczki HCV (ang. *envelope*)

ELISA – Test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ER – Siateczka wewnątrzplazmatyczna (ang. *endoplasmatic reticulum*)

HCC - Rak wątrobowokomórkowy (ang. *hepatocellular carcinoma*)

HCV - Wirus zapalenia wątroby typu C (WZW C, ang. *hepatitis C virus*)

HLA- Ludzkie antygeny leukocytarne (ang. *human leukocyte antigens*)

HSC - Wątrobowe komórki gwiazdziste (ang. *hepatic stellate cells*)

HVR – Region nadzmienny (ang. *hypervariable region*)

IDU - Dożylni narkomani (ang. *intravenous drug users*)

IFN - Interferon

IL - Interleukina

IRES – Wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (ang. *internal ribosome entry site*)

ISDR - Domena wrażliwości na interferon (ang. *IFN- a sensitivity determining region*)

KC – Komórki Kupffera

KIR – Receptory komórek podobne do immunoglobulin (ang. *killer-cell immunoglobulin-like receptors*)

LDL - Lipoproteina o niskiej gęstości (ang. *LDL – low-density lipoprotein*)

LPS – Lipopolisacharyd, endotoksyna

LSEC - Komórki wyściółki zatok (ang. *liver sinusoidal endothelial cells*)

MHC - Główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*)

MFI – Średnia intensywność fluorescencji (ang. *mean fluorescence intensity*)

MSM - Mężczyźni mający kontakty seksualne z mężczyznami (ang. *Men who have Sex with Men*)

NCRs – Receptory naturalnej cytotoxyczności (ang. *natural cytotoxicity receptors*)

NK - Komórki NK - naturalni zabójcy (ang. *Natural Killer*)

NKG2D – Receptor aktywujący komórek NK i limfocytów T CD8+

NKT - Limfocyty NKT (ang. *natural killer T-cells*)

NTR – Region niekodujący (ang. *nontranslated region*)

ORF – Otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)

p – Poziom istotności statystycznej

PAMPs - Wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen associated molecular patterns*)

PegIFN – Interferon pegylowany

PCR – Łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PRR - Receptory rozpoznające wzorce (ang. *pattern recognition receptors*)

PWID – Osoby używające środków/leków dożylnych (ang. *people who inject drugs*)

PZW C – Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C

r – Współczynnik korelacji

RANTES – CCL5, Chemokina  $\beta$  (ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*)

RBV – Rybawiryna

RdRp – RNA-zależna polimeraza RNA (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*)

Real Time-PCR - PCR w czasie rzeczywistym

SD – Odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)

STAT-C – Leki przeciwwirusowe swoiste dla HCV (ang. *specifically targeted antiviral treatment for hepatitis C*)

SVR – Utrwalona odpowiedź wirusologiczna (ang. *sustained virologic response*)

TGF- $\beta$  – Transformujący czynnik wzrostu (ang. *transforming growth factor beta*)

TLR - Receptory Toll-podobne (ang. *Toll-like receptors*)

TNF - Czynniki martwicy guza, czynniki nekrozy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*)

## 2. Wstęp

Współczesna medycyna stawia wiele wyzwań w zakresie rozwoju nowych metod leczenia, diagnostyki, profilaktyki. Jednocześnie oferuje nowoczesne możliwości metodyki badań, pozwalając „zajrzeć w głąb komórki”, przeanalizować procesy toczące się na poziomie jej metabolizmu, reakcji immunologicznych a nawet na poziomie molekularnej analizy genów. Warunkuje to dalszy postęp w dziedzinie medycyny.

Wirusowe zapalenie wątroby typu C jest chorobą dotykającą nawet 2-3 % populacji światowej. Może prowadzić do marskości wątroby, raka wątrobowokomórkowego, przewlekłego nosicielstwa, zgonu i wielu manifestacji pozawątrobowych.

Ze względu na zdolności mutagenne HCV (ang. *hepatitis C virus*), możliwość maskowania zakażenia przed układem obronnym organizmu gospodarza, istnieje wiele ograniczeń zarówno w zakresie leczenia jak i profilaktyki tej choroby. Dotychczas nie wynaleziono skutecznej szczepionki zapobiegającej zakażeniu. Ponadto dzisiejsza medycyna nie dysponuje odpowiednią profilaktyką poekspozycyjną. Terapia oparta na połączeniu interferonu z rybawiryną oraz inhibitorów proteazy również napotyka wiele ograniczeń ze względu na liczne przeciwwskazania, interakcje z innymi lekami, działania niepożądane. Obiecujące doniesienia na temat terapii dodatkowymi inhibitorami proteazy, analogami nukleozydowymi/nukleotydowymi, inhibitorami nienukleozydowymi HCV-RNA-zależnej polimerazy RNA, inhibitorami NS5A oraz inhibitorami cyklofiliny mogą wkrótce znaleźć odzwierciedlenie w standardowej terapii.

Bezpieczne postępowanie terapeutyczne, trafne rozumowanie w zakresie tworzenia nowych opcji leczniczych, szczepionek, wymaga szczegółowego zrozumienia patogenezy zakażenia, reakcji odpornościowej organizmu chorego szczególnie w zakresie odpowiedzi wrodzonej, która jak się wydaje ma istotne znaczenie w zakażeniu HCV. Szczególną rolę przypisuje się komórkom naturalnej cytotoksyczności, znanym jako komórki NK (ang. *natural killers*). Poniższa praca dedykowana jest roli tych komórek w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C.

## 2.1. Wirus zapalenia wątroby typu C

HCV po raz pierwszy został zidentyfikowany w 1989 roku. Praca QL Choo opublikowana w *Science* opisywała genom wirusa<sup>1</sup>. Dopiero później opisano budowę wirusa.

Wirus ten należy do małych wirusów otoczkowych z pojedynczą, dodatnio spolaryzowaną nicią RNA z rodziny *Flaviviridae*. Wewnątrz rodziny sklasyfikowany jest oddzielnie jako *hepacivirus*. Jest wirusem pierwotnie hepatotropowym, jednak jego replikację wykazano również w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, w szpiku kostnym oraz w ośrodkowym układzie nerwowym<sup>2</sup>.

Wirus ma budowę sferyczną, średnicę około 50-60 nm. Materiał genetyczny wirusa, rdzeń, otoczony jest ikosahedralnym kapsydem oraz zewnętrzną osłonką lipidową pochodzenia komórkowego, w której osadzone są glikoproteiny otoczki – E1 i E2.

Jest to wirus RNA, o wysokim potencjale mutagennym z uwagi na wirusową RNA-zależną polimerazę RNA – NS5B podatną na błędy. Skutkiem tego jest brak możliwości korekty mutacji i wysoki współczynnik replikacji<sup>3,4</sup>. Z tego względu obserwuje się wysoką różnorodność genetyczną wirusa u osób zakażonych. Wyróżnia się 7 głównych genotypów HCV, w obrębie których istnieje 67 subtypów, które wykazują około 20% zmienności<sup>5,6</sup>. Zmienność sekwencji nukleotydowej pomiędzy genotypami ocenia się na około 30%. Rozmieszczenie geograficzne poszczególnych genotypów i subtypów prezentuje Tabela 1. Filogenetycznie pochodzą one z Afryki i Azji<sup>5,7</sup>.

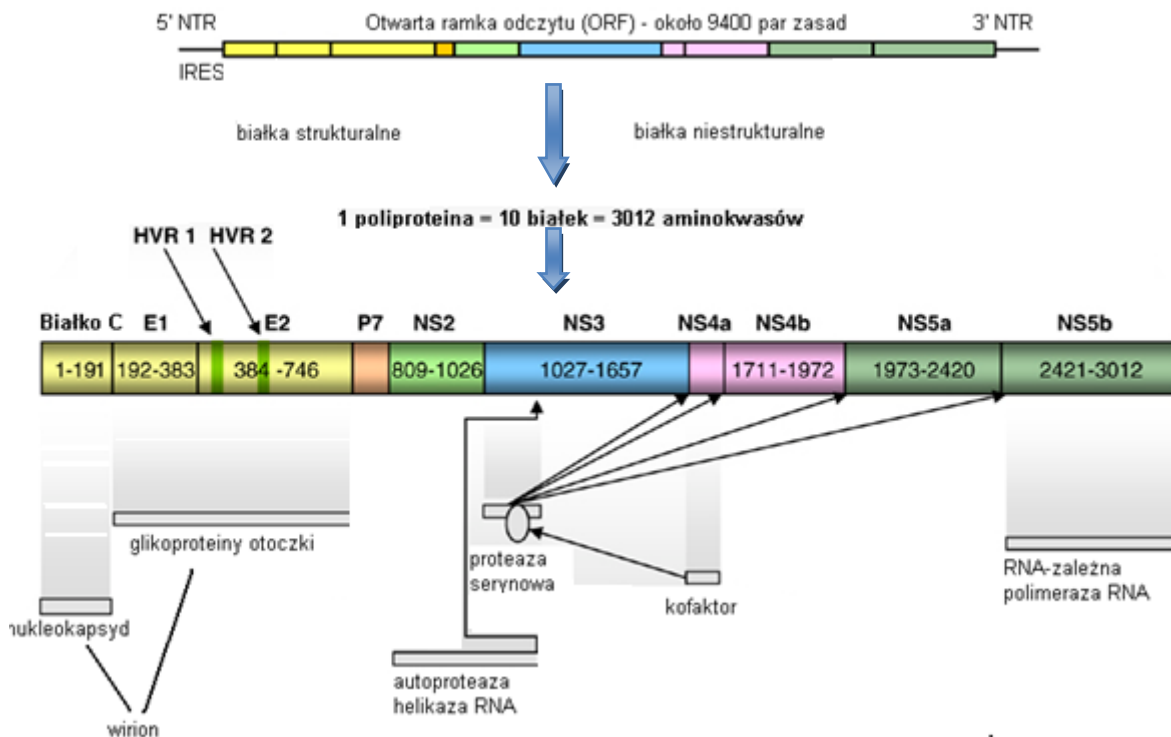


**Tabela 1. Rozmieszczenie geograficzne poszczególnych genotypów i subtypów na podstawie Nakano, T. [5] – modyfikacja własna.**

<b>Genotyp/ subtyp</b>	<b>występowanie</b>
1a	USA, Europa N
1b	Cały Świat (PWID w Europie) <sup>8</sup>
2a, 2b, 2c	Basen M. Śródziemnego, Daleki Wschód
3a	Cały Świat
3b	Azja
4	Środkowy Wschód, Od Środkowej do Północnej Afryki i Europy, Kanada
5a	Południowa Afryka, Francja, Belgia
6	Wschodnia Azja (6p-6s Kanada – imigranci z Azji)
7	Kanada, Belgia (możliwe, że do zakażenia doszło w Środkowej Afryce)

### **2.1.1. Genom wirusa, budowa wirusa**

Produktami genomu wirusa, który koduje około 9600 nukleotydów, są białka strukturalne (rdzeniowe, otoczki białko p7) i niestukturalne (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) <sup>7</sup>. Schematycznie układ genów zamieszczono na Rycinie 1.



**Rycina 1. Budowa genomu wirusa HCV. Objasnienia skrótów w tekście oraz w wykazie skrótów. Na podstawie Lloyd A.R.<sup>9</sup> - modyfikacja własna.**

**Białko rdzeniowe (core)** chroni materiał genetyczny wirusa, tworząc nukleokapsyd. Translacja jego sekwencji nukleotydowej zaczyna się w kodonie AUG w pozycji 342 genomu H77, w miejscu, gdzie zaczyna się translacja całości genomu HCV. Oprócz tego, że jest białkiem strukturalnym, jest również białkiem regulatorowym, odpowiadającym za wiązanie wirusowego RNA, regulację translacji RNA, składanie cząsteczki; może wiązać się z receptorami TLR, wpływając na aktywację zapalenia; jest białkiem włączonym w sygnałowanie komórki, apoptozę, metabolizm lipidowy i karcynogenezę<sup>10-12</sup>.

**E1, E2** są to geny kodujące przezbłonowe białka otoczki wirusa. Poza funkcją strukturalną, włączają się w adsorpcję wirusa do receptora tetraspaniny CD81, umożliwiającego wejście wirusa do komórki, i receptora lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. *LDL – low-density lipoprotein*) komórek zakażanych. Białko E2 posiada 2 rejony hiperzmiennie, będące miejscem zmienności epitopów, głównym celem dla przeciwciał neutralizujących i jednocześnie wyzwaniem dla wakcynologów<sup>10</sup>.

Gen **NS3** koduje białko o aktywności ATPazy/helikazy. Białko niestrukturalne NS3 jest kluczowym białkiem dla zakaźności wirusa. Podobnie jak białko C, może łączyć się z receptorami TLR<sup>11,13</sup>. Jest potencjalnym celem terapeutycznym dla inhibitorów proteazy NS3. Do swojej prawidłowej aktywności białko NS3 potrzebuje białka NS4A jako kofaktora.

Gen **NS1**, po translacji tworzy białko błonowe, które nie jest kluczowe dla replikacji wirusa, ale odgrywa ważną rolę w formowaniu zakaźnych wirionów.

**NS5A** to gen kodujący RNA-zależną polimerazę RNA, zawierając domenę wrażliwości na interferon (ang. *IFN- a sensitivity determining region - ISDR*), odgrywa znaczącą rolę w odpowiedzi na leczenie interferonem. Rosnąca liczba mutacji w tym regionie koreluje z brakiem SVR<sup>14</sup>. **NS5B** odpowiada za syntezę ujemnego łańcucha RNA, jest polimerazą RNA-zależną (RdRp) podatną na błędy (częstość błędu –  $10^{-3}$  rybonukleotydu na cykl) przez co wirus mutuje nie tylko między różnymi pacjentami, ale także osobniczo. **NS4A** jest kofaktorem dla proteazy serynowej NS3. **NS4B** jest kluczowym białkiem dla replikacji HCV, a w związku z tym kolejnym celem terapeutycznym. Tworzy „platformę” do replikacji wirusa. Fragmenty **5`NTR** i **3`NTR** są to sekwencje wysoce konserwatywne, nie podlegające translacji, znajdujące się na końcu 5` i 3` genomu. Na końcu 5`NTR znajduje się IRES, gdzie wiążą się rybosomy w procesie translacji<sup>10,14</sup>.

### 2.1.2. Cykl replikacyjny wirusa HCV

Wejście do komórki. Fuzja. Po przyłączeniu się do komórki gospodarza wirus HCV uwalnia swój nukleokapsyd do wnętrza komórki. Wejście do komórki uzależnione jest od pH i endocytozy za pośrednictwem klatryny, białka, będącego składnikiem wpukleń błony komórkowej u *Eukaryota*. Następnie z cytoplazmy komórki nukleokapsyd przechodzi do endosomu.

Translacja. IRES (ang. *internal ribosome entry site*) jest to zbiór domen i nukleotydów na końcu 5` genomu wirusa. IRES tworzy stabilny kompleks preinicjujący translację poprzez wiązanie rybosomalnej podjednostki 40S z czynnikami zapoczątkowującymi translację. Następnie podjednostka ta wiąże czynniki translacyjne komórki gospodarza i wirusa z tRNA. Po kolejnych hydrolizach trójfosforanu guanozyny, asocjacji podjednostek rybosomalnych i uformowaniu rybosomów 80S, dochodzi do inicjacji syntezy białek wirusowych.

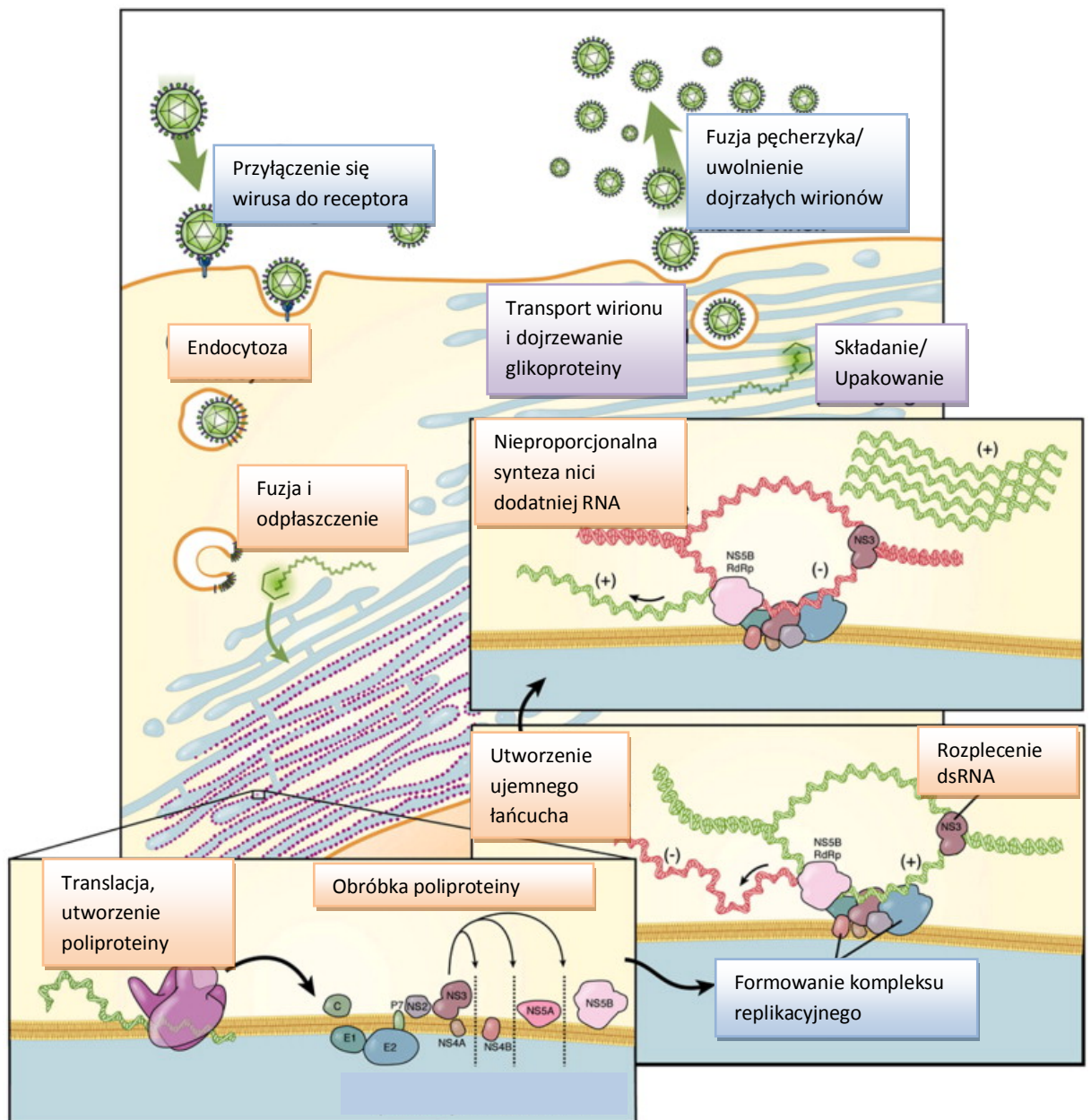
Obróbka potranslacyjna. Poliproteiny prekursorowe są translokowane do światła retikulum endoplazmatycznego (ang. ER – *endoplasmatic reticulum*). Ma tu miejsce kilkietapowe „dojrzewanie” białek.

Replikacja. Przy pomocy RdRp zostaje odtworzony ujemny łańcuch RNA na podstawie dodatniego RNA genomowego wirusa. W kolejnym etapie powstają łańcuchy o polarności

dodatkowej, które posłużą do translacji białek, syntezy czynników pośrednich replikacji i tworzenia nowych cząstek wirusowych.

Składanie i uwalnianie wirusa. Interakcja białka rdzeniowego z genomowym RNA prawdopodobnie przełącza proces replikacji do pakowania cząstki wirusowej. Cały proces formowania wirusa prawdopodobnie ma miejsce w ER, w którego siateczce wiążą się glikoproteiny otoczkowe wirusa. Białka strukturalne wirusa występują zarówno w ER jak i aparacie Golgiego. Obecność N-glikanu na powierzchni cząsteczki wirusa świadczy o udziale aparatu Golgiego w dojrzewaniu wirionu. Transport wirusa do przestrzeni okołokomórkowej zachodzi konstitutywnymi drogami wydzielniczymi<sup>10,14,15</sup>.

Na Rycinie 2 przedstawiono model replikacyjny wirusa HCV. Opis w tekście.



Rycina 2. Model replikacji wirusa HCV. Modyfikacja własna na podstawie Pawlowsky, J.M. <sup>12</sup>

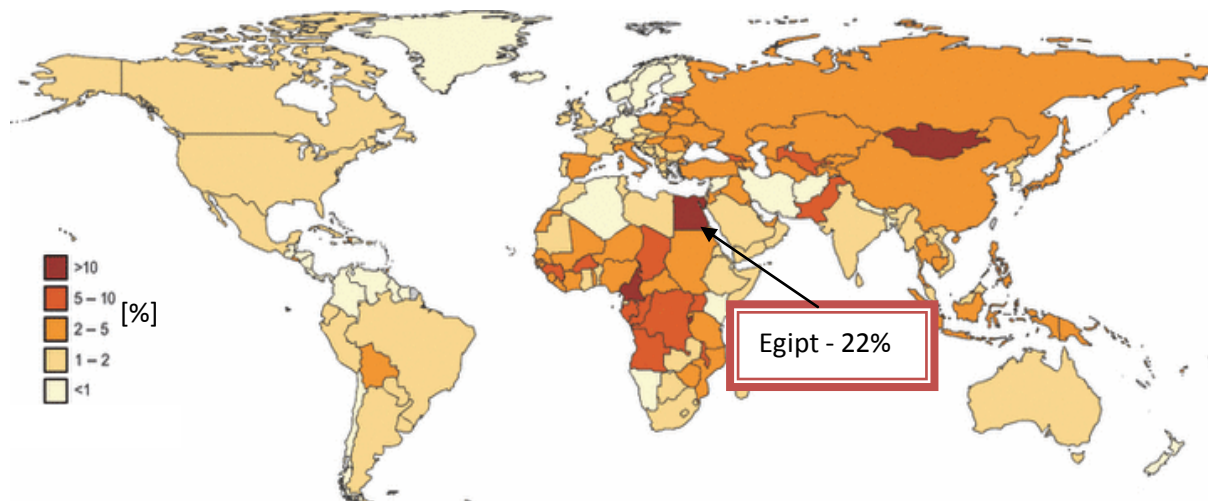
## 2.2. Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C (PZWC)

PZWC nosi znamiona „cichej epidemii”. Znaczna część populacji światowej jest zakażona wirusem HCV i nie jest tego świadoma. Z uwagi na niską rozpoznawalność zakażenia w stadium ostrej choroby (około 25% przypadków) określenie liczby świeżych zachorowań nie jest możliwe. Dopiero kiedy choroba postępuje w kierunku marskości wątroby, jej dekompensacji, czy raka wątrobowokomórkowego, ujawnia się. Wówczas niejednokrotnie jest już zbyt późno na podjęcie skutecznego leczenia, które byłyby w zasięgu przy wcześniejszej diagnozie. Znakomita większość zakażeń HCV wykrywana jest przypadkowo.

### 2.2.1. Epidemiologia

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organisation*) około 130-170 milionów osób jest zakażonych wirusem HCV (w Europie 2-5 mln), co stanowi około 2.35% populacji światowej. Według niektórych autorów nawet 210 milionów ludzi jest zakażonych, co daje 3,3% populacji światowej. Każdego roku 3-4 miliony ludzi zakaża się wirusem HCV; powyżej 350 000 osób umiera rocznie z powodu chorób związanych z wirusowym zapaleniem wątroby typu C<sup>6,16,17</sup>.

Według danych CDC z 2012 roku zachorowalność różni się w zależności od regionu Świata. Maksimum osiąga w Afryce (Egipt – 22%) i na Zachodnim Pacyfiku, minimum – w Europie i Ameryce Północnej. Najwyższą częstość zakażeń w Europie szacuje się we Włoszech, Rumunii, na Sycylii (>8%) i ogólnie w krajach Basenu Morza Śródziemnego (około 4%), najniższą zaś w krajach skandynawskich, Francji, Wielkiej Brytanii i w Niemczech (<0,5%)<sup>18</sup>. Na Rycinie 3. przedstawiono częstość zakażeń HCV na świecie.



**Rycina 3. Częstość zakażeń HCV na świecie na rok 2010 – modyfikacja własna na podstawie Lavanchy, D.<sup>19</sup>**

Szacuje się, że w Polsce ok. 730 tys. osób miało kontakt z wirusem, co stanowi 1,9% (0.6 to 2.1%) populacji ogólnej<sup>20</sup>. W populacji osób starszych sięga nawet 2,93%<sup>21</sup>. Z racji wysokiej aktywności wirusa 230 tys. osób, (31% osób anty-HCV dodatnich), powinno podlegać terapii, jednak do tej pory obecność przeciwciał anty-HCV potwierdzono jedynie u 50 tys. osób<sup>20</sup>.

Według analiz retrospektywnych liczba zachorowań sukcesywnie spada dzięki zwiększeniu edukacji w zakresie transmisji wirusów HCV, HBV i HIV; niemalże do zera zredukowano możliwość zakażenia poprzez transfuzję krwi<sup>22</sup>.

### 2.2.2. Drogi przenoszenia

Wirus najczęściej przenoszony jest drogą parenteralną. Wśród możliwych dróg zakażenia wymienia się (w kolejności od najbardziej ryzykownych): dożylny podanie leku/narkotyku, transfuzja krwi przed 1991-94 rokiem, hemodializa, ryzykowne kontakty seksualne, pobyt w więzieniu, okaleczanie się związane z religią, *piercing*, tatuaż, podanie immunoglobulin. Personel medyczny jest narażony zawodowo na zakażenie poprzez zakłucie igłą chorego, czy innym narzędziem medycznym, mającym kontakt z krwią chorego. Ryzyko serokonwersji do anty-HCV przy zakłuciu ocenia się na około 2- 3%.

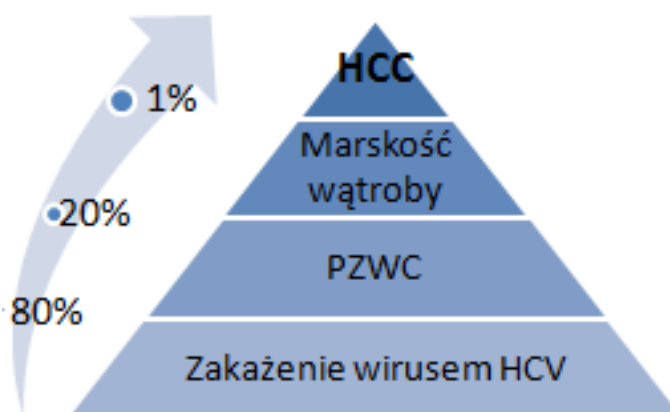
W grupie ryzyka zachowań homoseksualnych MSM (ang. *Men who have Sex with Men*) ryzyko zakażenia rośnie do 4-8%. Częstość zakażeń tą drogą zwiększa się. Zaznacza się wzrost zakażeń HCV u HIV-dodatnich homoseksualistów<sup>14,22</sup>.

Ryzyko zakażenia okołoporodowego ocenia się na 5% i mniej w zależności od wiremii u matki dziecka. Przy koinfekcji z HIV rośnie powyżej 20%. Nie wykazano zwiększonego ryzyka transmisji wirusa na dziecko karmione piersią przez matkę HCV dodatnią<sup>8,18,22,23</sup>.

### 2.2.3. Obraz kliniczny. Przebieg zakażenia

Ostre zapalenie wątroby typu C zazwyczaj przebiega bezobjawowo. Przewlekłe zapalenie wątroby również może przebiegać pierwotnie bezobjawowo. PZWC u około 20-30% pacjentów po 20-30 latach choroby może prowadzić do marskości wątroby, a w kolejnym etapie do rozwoju raka wątrobowokomórkowego czy zgonu pacjenta.

Rycina 4. przedstawia kolejne etapy zakażenia HCV i ich procentowy rozkład u chorych w czasie trwania zakażenia. Zakażenie HCV w około 80-90% prowadzi do zakażenia przewlekłego, to znaczy, że przeciwciała anty – HCV utrzymują się we krwi zakażonego powyżej 6 miesięcy od ekspozycji. Zaledwie nieznaczna część zakażonych eliminuje wirusa.



**Rycina 4. Etapy zakażenia HCV i procentowy rozkład progresji choroby.**

U większości pacjentów świeżo zakażonych wirusem HCV nie obserwuje objawów choroby lub przechodzi to zakażenie łagodnie. W ostrym zapaleniu żółtaczka pojawia się u 1 na 4 pacjentów. Wśród objawów klinicznych obserwuje się także zmęczenie, ogólne rozbitcie, nudności, ból w okolicy prawego górnego kwadrantu brzucha. U osób o objawowym przebiegu choroby ostra faza trwa około 2-12 tygodni. Przebieg objawowy choroby prawdopodobnie nie ma związku z eliminacją wirusa. Wpływ może mieć rodzaj transmisji wirusa, wiek zakażonego<sup>17</sup>. Piorunujący przebieg w przypadku ostrego zakażenia HCV jest bardzo rzadki. Może mieć miejsce np.



w koinfekcji innym wirusem hepatotropowym, jak na przykład wirusem zapalenia wątroby typu B<sup>22,24</sup>.

Według ostatnich badań wśród czynników mogących znacząco wpływać na proces eliminacji wirusa można wymienić<sup>14,22</sup>:

- ✓ Czynniki immunologiczne i genetyczne:
  - limfocyty T CD4<sup>+</sup>,
  - komórki NK,
  - miano przeciwciał anti-HCV, wcześniejszy kontakt z wirusem HCV
  - polimorfizm genu I28B,
  - allele HLA-DRB1, HLA-DQB1
- ✓ Pozostałe czynniki ze strony gospodarza:
  - rodzaj ekspozycji,
  - wiek i płeć,
  - narodowość (np. HCC częściej występuje w Japonii),
  - pochodzenie etniczne,
  - układu używanie alkoholu, innych używek,
- ✓ Czynniki ze strony wirusa
  - genotyp
  - koinfekcje.

Model progresji choroby może zależeć od wielu czynników. Z dotychczas poznanych czynników predysponujących do szybszego postępu choroby można wymienić:

- płeć męską,
- wiek powyżej 40 roku życia,
- spożywanie alkoholu,
- steroidy, cukrzyca, otyłość,
- koinfekcja HBV/HIV (i niski poziom komórek CD4),
- nadkażenie innymi genotypami HCV
- zwłóknienie, stłuszczenie wątroby.

Genotyp nie ma wpływu na zwłóknienie wątroby<sup>25,26</sup>.

Przewlekłe zapalenie wątroby typu C. Jeżeli wirus jest obecny we krwi 6 miesięcy od ekspozycji, mówimy o zakażeniu przewlekłym. Dzięki ogromnej różnorodności genetycznej wirusa, mutagenności, wirus nie może być efektywnie zwalczony przez układ immunologiczny gospodarza, co skutkuje przewlekłością procesu u 80% zakażonych.

Najczęściej zgłaszanym objawem przez pacjentów jest przewlekłe uczucie zmęczenia. Znacznie rzadziej obserwuje się nudności, osłabienie, utratę masy ciała, bóle mięśni czy stawów. Objawy te są jednak niespecyficzne i nie korelują z progresją choroby.

Badania laboratoryjne mogą wykazać wzrost aminotransferaz, zwłaszcza zwiększoną aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT). U około 30% chorych aktywność ALT jest w normie i chorzy ci prezentują łagodny przebieg choroby. U zakażonych przewlekłe zwykle występuje cytopenia w zakresie jednej z trzech linii komórkowych. Szacuje się, że u 0,1-0,3% chorych może wystąpić aplazja szpiku, wówczas zaburzone są wszystkie linie komórkowe<sup>27</sup>. Łagodna neutropenia występuje bardzo często i zwykle wiąże się z nadcisnieniem wrotnym i hipersplenizmem<sup>28</sup>. Neutropenia i trombocytopenia występują niezależnie od anemii oraz bez związku ze statusem wirusologicznym<sup>29</sup>. Dla kontrastu u chorych "naiwnych" obserwowano wzrost liczby limfocytów atypowych<sup>30</sup>.

U większości zakażonych nie obserwuje się objawów choroby do czasu pełnoobjawowej marskości wątroby z dekompenzacją tego narządu. Ryzyko rozwoju marskości przez 20 lat choroby jest oceniane na 10-20%<sup>25</sup>. Średni czas od infekcji do ewolucji zaawansowanego włóknienia to około 30 lat<sup>26</sup>.

#### **2.2.4. Powikłania**

W badaniu klinicznym u pacjentów z wyrównaną marskością wątroby obserwuje się hepato- i/lub splenomegalię, rumień dłoniowy, pajęczki naczyniowe, atrofię jąder, ginekomastię. Plamica małopłytkowa o podłożu immunologicznym występuje zdecydowanie częściej u pacjentów zakażonych wirusem C (22-30%) w stosunku osób zdrowych (0,4%)<sup>31</sup>.

Kolejnym etapem progresji choroby jest dekompenacja wątroby pod postacią wodobrzusza, uogólnionych obrzęków, krwawienia z żyłaków przełyku, encefalopatii wątrobowej i żółtaczki. U osób z marskością wątroby dekompenacja wątroby ma miejsce prawie u 5% chorych rocznie<sup>25</sup>.

U 30-40% chorych pojawiają się pozawątrobowe manifestacje zakażenia. Wśród zaburzeń hematologicznych wyróżnia się krioglobulinemię mieszaną. Stosunkowo często rozpoznaje się choroby autoimmunizacyjne, chłoniaka, błoniasto-rozplemowe zapalenie nerek, choroby skóry

(porfirie skórna późna, liszaj płaski) czy też cukrzycę, patologię tarczycy, idiopatyczne włóknienie płuc, kardiomiopatię<sup>32</sup>.

Rak wątrobowokomórkowy w zakażeniu wirusem C rozwija się na podłożu marskości. Nawet jeśli wirus zostanie eradykowany, chorzy z marskością pozostają w grupie zwiększonego ryzyka HCC jak i innych powikłań zagrażających życiu<sup>17</sup>.

W Tabeli 2 przedstawiono częstość powikłań u chorych z marskością wątroby lub z chorobami współistniejącymi. Wśród nich wyróżnia się: zakażenie wirusem HBV (czy innym wirusem hepatotropowym), HIV, nadużywanie alkoholu, cukrzyca, chorobą metaboliczną wątroby i inne<sup>33</sup>.

**Tabela 2. Ryzyko powikłań u chorych z dodatnim HCV-RNA z wyrównaną marskością wątroby w zależności od istnienia lub braku dodatkowych obciążeń wątroby (kofaktorów). Na podstawie Massard, J [26] - modyfikacja własna.**

Powikłanie	Łącznie	Bez kofaktorów	+ kofaktor
Wodobrzusze	2,9%	2,8%	3,2%
Żółtaczka	2,0%	1,6%	4,1%
Krwawienie z przewodu pokarmowego	0,7%	0,3%	0,8%
Encefalopatia	0,1%	0,1%	0,1%
HCC	3,9%	3,7%	4,9%
Zgon	4,0%	3,6%	5,7%

### 2.2.5. Diagnostyka

Rozpoznanie zakażenia w przypadku ostrego zapalenia wątroby można postawić już po kilku dniach do 8 tygodni od ekspozycji na wirusa na podstawie badania PCR, a na podstawie dodatnich przeciwciał anti-HCV po 8-10 tygodniach (6-12 tygodniach) od narażenia. Testy 3-ej generacji EIA, pozwalają na detekcję przeciwciał po 4-6 tygodniach z czułością nawet 99%. U około 20% świeżo zakażonych pacjentów dochodzi do negatywizacji wyniku PCR - HCV-RNA, co świadczy o wyleczeniu<sup>34</sup>.

Jakościową i ilościową ocenę obecności materiału genetycznego wirusa umożliwia klasyczna łańcuchowa reakcja polimerazy PCR lub „Real-time” PCR. Testy jakościowe muszą wykrywać minimum 50 HCV RNA IU/ml i mieć jednakową czułość dla wszystkich genotypów. Dla testów opartych na Real-time PCR dolna granica wykrywalności to 5-30 IU/ml.

Genotypowanie, to metoda molekularnej oceny genotypu na podstawie analizy sekwencji niekodującej regionu 5' - NS5B lub E1 genomu wirusa HCV.

Możliwa jest również ocena ilościowa antygeny rdzeniowego HCV – HCV Ag. Test ten jest mniej czuły w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C . Wykazano jednak, że poziom HCV Ag koreluje z HCV RNA i może być również markerem replikacji wirusa <sup>35</sup>.

Biopsja wątroby pozostaje „złotym standardem” w ocenie patomorfologicznej wątroby. Dostępne są również metody nieinwazyjne - elastografia. W połączeniu z markerami serologicznymi jej przydatność diagnostyczna jest porównywalna z biopsją <sup>17</sup>.

U osób świeżo zakażonych można wykazać dodatnie HCV-RNA przy negatywnym badaniu przeciwciał. W późniejszym okresie od zakażenia, obydwa badania mogą być pozytywne, co może mieć również miejsce u zakażonych przewlekłe z dodatkową przyczyną ostrego zapalenia wątroby i w zaostrzeniach u chorych przewlekłe <sup>17</sup>. Jeśli oba testy są negatywne zakażenie ostre jest mało prawdopodobne. Jeżeli jedynie przeciwciała są dodatnie, należy zbadać pacjenta powtórnie po upływie kilku tygodni z uwagi na możliwość przejściowej kontroli układu immunologicznego nad replikacją wirusa. Zazwyczaj jednak świadczy to o przebytej infekcji HCV.

W przypadku zakażenia przewlekłego zarówno wynik badania przeciwciał jak i HCV RNA jest pozytywny. Wyjątek stanowią pacjenci z głębokimi niedoborami immunologicznymi, hemodializowani i chorujący na agammaglobulinemię <sup>17</sup>. Fałszywie dodatnie wyniki obserwuje się u chorych z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym.

U pacjentów nieleczonych należy prowadzić systematyczny bilans progresji choroby na podstawie badań laboratoryjnych, obrazowych jak i histopatologicznych lub im odpowiadających <sup>34,36</sup>.

Wzrost aktywności aminotransferaz, głównie w zakresie ALT, obserwuje się średnio po 6-12 tygodniach od zakażenia. W fazie ostrej enzymy wątrobowe wzrastają około 10-30 x powyżej górnej granicy normy. Wyniki te nie korelują ze stanem wątroby. U około 40% chorych uwagę zwraca normalizacja aminotransferaz w trakcie ustępowania objawów ostrego zakażenia. Zaznacza się wzrost stężenia bilirubiny w surowicy krwi, hypoalbuminemia <sup>37,38</sup>. Zwiększone wartości AFP ( $\alpha$ -fetoproteina) niekoniecznie muszą wskazywać na rozwój HCC, jednakże według dotychczasowych standardów AFP powyżej 400 ng/ml może być zapowiedzią transformacji nowotworowej.

## 2.2.6. Leczenie

Przez ostatnie 15 lat dokonał się ogromny postęp w leczeniu PZWC. Początkowo stosowano interferon  $\alpha$  w monoterapii, osiągając SVR u poniżej 10% leczonych. Dzisiaj – skuteczność nowoczesnych terapii jest niemalże 10-krotnie wyższa.

### 2.2.6.1. Wskazania do leczenia

Leczenie immunomodulujące, przeciwwirusowe należy wdrożyć u chorych z obecnym materiałem genetycznym wirusa niezależnie od aktywności ALT, ze zmianami zapalnymi wątroby i włóknieniem, co najmniej umiarkowanego stopnia. Takie postępowanie terapeutyczne ma również zastosowanie u pacjentów z wyrównaną marskością wątroby, z reaktywacją zakażenia po wcześniejszym leczeniu, w reterapii, w oczekiwaniu na transplantację wątroby, reaktywacji zakażenia po przeszczepie, a także u chorych z manifestacją pozawątrobową na tle zakażenia HCV. Przeciwwskazaniem do leczenia przeciwwirusowego mogą być jednak liczne potencjalne działania uboczne spotęgowane obecnością zaawansowanej choroby wątroby. Stąd duże nadzieje budzą nowe opcje terapeutyczne pozbawione udziału interferonu. W przypadkach dekompensacji wątroby należy rozważyć pilne przeszczepienie tego narządu.

### 2.2.6.2. Leki

Współczesnym standardem terapii PZWC jest terapia skojarzona pegylowanym interferon  $\alpha$  (PegINF $\alpha$ ) z rybawiryną (RBV) oraz – wyłącznie u chorych z genotypem 1- z inhibitorami proteazy serynowej (telaprewir i boceprewir), hamującymi enzymy umożliwiające replikację. Te ostatnie są przedstawicielami terapii przeciwwirusowej STAT – C (ang. *specificially targeted antiviral treatment for hepatitis C*), a także pierwszej generacji leków bezpośrednio skierowanych na wirusa i jego cykl replikacyjny (DAA – ang. *direct-acting antivirals*).

Ich dołączenie do terapii u pacjentów naiwnych (wcześniej nie leczonych) zakażonych genotypem 1 HCV zwiększa szanse na SVR do 75%. Zawsze należy je jednak stosować w kombinacji z PegIFN+RBV z uwagi na ryzyko oporności. Niestety należy nadal mieć na uwadze wysoki koszt leczenia terapii trójlekowej a przede wszystkim ryzyko działań niepożądanych<sup>14,39,40</sup>.

Kolejne leki DAA – drugiej generacji, są obecnie na etapie badań klinicznych. Wyróżnia się w tej grupie m.in.: dodatkowe inhibitory proteazy, analogi nukleozydowe/nukleotydowe, inhibitory nienukleozydowe HCV-RNA-zależnej polimerazy RNA, inhibitory NS5A, inhibitory cyklofiliny<sup>17</sup>.

Do grupy inhibitorów proteazy NS3/4A zalicza się m.in.: asunaprewir, waniprewir, danoprewir, simeprewir, których zastosowanie zwiększa tolerancję i profil bezpieczeństwa leczenia przeciwwirusowego.

Kolejną dużą grupą są inhibitory wysoce konserwatywnej polimerazy NS5B: nukleot(z)ydowe i nienukleotydowe (NNI - ang. *non-nucleoside inhibitors*). Do pierwszej podgrupy zalicza się: mericytabinę i sofosbuwir, które będąc "wadliwym" substratem polimerazy (RdRp), hamują replikację. NNI (m.in. tegobuwir i filibuwir) wiążą się na zewnątrz od centrum aktywnego polimerazy i wpływają na zmianę konformacji białka.

Inhibitory NS5A, jak daklataswir, ABT-267, hamują produkcję wirionów i cykl życiowy wirusa.

Innym celem terapii przyszłości są czynniki ze strony gospodarza, jak np. cyklofilina, przeciwko której działa alisporowir, zaburzający interakcję cyklofiliny z RdRp. Innym lekiem z tej grupy jest mirwirsen, działający przeciwko odpowiedzialnemu za ekspresję genów i replikację mikro-RNA miR-122, który jest specyficzny dla wątroby. Interferon  $\lambda$  zaś, jest konkurencyjną opcją terapeutyczną dla obecnie stosowanego interferonu  $\alpha$  ze względu na jego znacznie większą swoistość w stosunku do wątroby, za czym idzie mniejsze ryzyko toksyczności.

Obecnie prowadzi się badania nad nowymi schematami terapeutycznymi z zastosowaniem w.w. leków. Obiecujące wydają się być połączenia takie jak: daklataswir z sofosbuwirem<sup>39</sup>; danoprewir z mericytabiną; sofosbuwir z RBV i PegINF $\alpha$ ; ABT-450 i ritonawirem<sup>41</sup>. Pierwsza z wymienionych opcji pozwala na uzyskanie SVR12 u 98% chorych niezależnie czy byli wcześniej leczeni (niezależnie od oporności na inhibitory proteazy serynowej) czy nie, niezależnie od genotypu wirusa (1a czy 1b), polimorfizmu IL-28B, niezależnie od dołączenia RBV<sup>39</sup>. Niekwestionowanymi zaletami nowych leków jest znacząco wyższa skuteczność przy krótszym czasie leczenia, niezależność schematu leczenia od genotypu wirusa, łatwiejsza administracja leku i zminimalizowanie działań ubocznych, co zapewnia lepszą adherencję pacjenta<sup>6</sup>.

### 2.2.6.3. Schematy leczenia

Leczenie ostrego objawowego zakażenia prowadzi się IFN $\alpha$  lub PegIFN $\alpha$  w monoterapii przez 24 tygodnie. Takie postępowanie (PegIFN $\alpha$ ) może uchronić przed przejściem ostrego zakażenia w przewlekłe nawet w 90% przypadków, jeśli rozpoczęto je odpowiednio wcześniej<sup>42,43</sup>.

Pacjentów z PZWC naiwnych (wcześniej nieleczonych) z genotypem 1 można leczyć według schematu PEG-IFN+RBV+PI. Ewentualnie u pacjentów bez zaawansowanego włóknienia, z niskim HCV RNA i genotypem c/c IL28 można zastosować schemat dwulekowy. Jeśli jest to możliwe, w 4 tygodniu leczenia, należy wówczas ocenić ładunek wirusowy, jeśli nie jest ujemny, nie uzyskano RVR, dołączyć PI.

Boceprewir (BOC) można włączyć w 4 tygodniu leczenia PegIFN $\alpha$  z RBV (PR). W 8 i 24 tygodniu należy zbadać poziom HCV RNA i dalej w zależności od wyniku modyfikować leczenie. Jeśli wyniki są w obu badaniach ujemne u osób naiwnych, leczenie prowadzić należy przez 28 tygodni (PR – 4 tygodnie, PR+BOC – 24 tygodnie). Jeśli w tej samej grupie chorych pierwszy wynik jest dodatni, kolejny- ujemny: leczenie trwa 48 tygodni (PR – 4 tygodnie, PR+BOC – 44 tygodnie). Wcześniej leczeni nieskutecznie i chorzy z marskością wątroby powinni być leczeni 48 tygodni (PR – 4 tygodnie, PR+BOC – 44 tygodnie). Jeśli pojawią się działania niepożądane leku leczenie od 36 tygodnia leczenia można kontynuować leczenie PR. Warto również dokonać oceny ilościowej HCV RNA w 12 tygodniu leczenia. Kolejnym momentem potencjalnego przerwania terapii trójlekowej jest 24 tydzień terapii, jeśli HCV RNA jest dodatni<sup>17</sup>.

W przypadku leczenia trójlekowego z użyciem telaprewiru (TVR) zarówno chorych naiwnych jak u tych z nawrotami wirerii po wcześniejszym leczeniu, lek włącza się razem z PR i kontynuuje przez 12 tygodni. Następne 12 tygodni chory leczony jest wyłącznie PR. U chorych z marskością, u wcześniej nieskutecznie leczonych i jeśli w 4 lub 12 tygodniu HCV RNA jest dodatni, leczenie PR kontynuuje się do 48 tygodni.

### 2.2.7. Ocena leczenia i rokowanie

Wśród czynników wpływających na ostateczny wynik leczenia można wymienić: genotyp wirusa, ładunek wirusowy odnotowany przed wdrożeniem leczenia, masę ciała zakażonego – BMI (*body mass index*) jak i jego wiek i płeć, współistniejące zaburzenia metaboliczne oraz stan

włóknienia i stłuszczenia wątroby przed leczeniem, obecność insulino oporności<sup>14,44</sup>. Nie mają one jednak większego znaczenia dla skuteczności leczenia trójlekowego, z wyjątkiem różnicowania genotypu – 1a a 1b<sup>14</sup>. Obszarami zwiększenia skuteczności terapii przeciwwirusowej oraz immunomodulującej są sumienne monitorowanie odpowiedzi na leczenie, indywidualizacja podaży leków inhibujących replikację wirusa oraz odpowiedni czas trwania terapii.

Skuteczność leczenia ocenia osiągnięcie punkt końcowego terapii – SVR (*sustained virological response*) –przetrwała odpowiedź wirusologiczna, definiowana jako negatywizacja wyniku HCV RNA w surowicy krwi (poniżej 50 IU/ml) w 24 tygodniu (tj. 6 miesięcy) po zakończeniu leczenia. U tych pacjentów znacząco zmniejsza się ryzyko HCC i zgonu<sup>17,45</sup>. W ocenie leczenia stosuje się kryteria obniżania się HCV RNA w trakcie leczenia w kolejnych tygodniach, tj. w 4, 12, 24 itp.<sup>17</sup>, co przedstawiono w Tabeli 3.

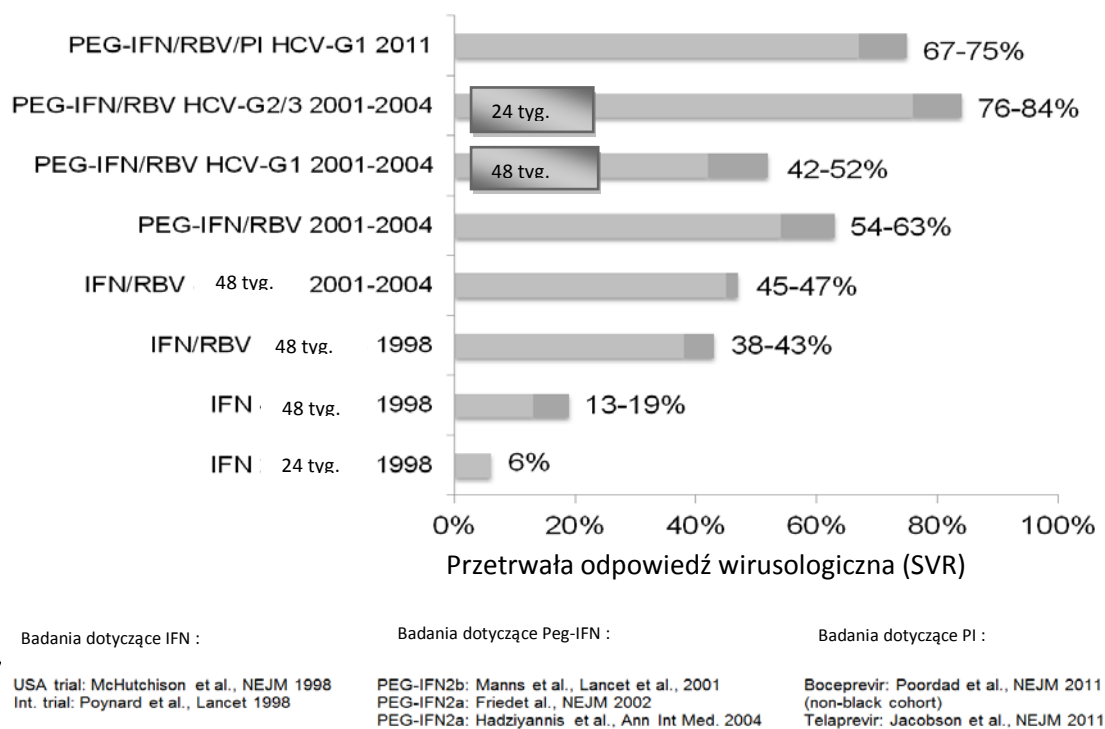
**Tabela 3. Oznaczenia używane w ocenie odpowiedzi wirusologicznej na leczenie.**

HCV RNA niewykrywalne (<25 IU/mL) - [tygodnie leczenia]	Oznaczenie	Objaśnienie
4	RVR	szybka odpowiedź wirusologiczna, ang. <i>rapid viral response</i>
12	EVR	wczesna odpowiedź wirusologiczna ang. <i>early viral response</i>
24 bez EVR	DVR	późna odpowiedź wirusologiczna ang. <i>delayed viral response</i>
Koniec terapii	ETR	odp. wirusologiczna na koniec terapii ang. <i>early treatment response</i>
12 po zakończeniu terapii	SVR12	trwała odp. wirusologiczna w 12 tyg., ang. <i>sustained viral response 12</i>
24 po zakończeniu terapii	SVR24	trwała odp. wirusologiczna w 24 tyg., ang. <i>sustained viral response 24</i>

Bierze się pod uwagę czynniki predykcyjne dobrej odpowiedzi na koniec leczenia, jeśli w 12 tygodniu leczenia wiremia będzie ujemna; wówczas u 60-90 % pacjentów można zaobserwować SVR. Czyni się również próby skrócenia leczenia u pacjentów z genotypem 1 do 24 tygodni, klasycznie leczonych przez okres 48 tygodni, jeśli wiremia była ujemna w 4 tygodniu od rozpoczęcia terapii. Odpowiedź na leczenie dwulekowe w zależności od genotypu przedstawia się następująco: 40-50% dla genotypu 1 i 75-85% dla genotypu 2 i 3; u dzieci dla genotypu nie-3a – 77,8% .Częstość SVR dla genotypu 4 jest nieznacznie wyższa niż dla genotypu 1<sup>4,17,44,46</sup>.



Terapia 3-lekowa vs. terapia klasyczna, 2-lekowa, osiąga SVR odpowiednio 66-75% (w reterapii do 65%) vs. 38-44%<sup>6</sup>. Podsumowanie, dotyczące skuteczności poszczególnych opcji terapeutycznych, przedstawia Rycina 5.



**Rycina 5. Rozwój leczenia przewlekłego zakażenia HCV i jego skuteczność u pacjentów wcześniej nieleczonych (naiwnych). Na podstawie Mauss, S.<sup>14</sup> – modyfikacja własna.**

Obecność genotypu C/C IL-28B (27,1% w polskiej populacji) w porównaniu z genotypem C/T (56,4%) czy T/T (16,5%) daje większe szanse na uzyskanie SVR w terapii dwulekowej - odpowiednio: 61,5% vs. 26,7% vs. 23,3%<sup>47</sup>. Polimorfizm tego genu może mieć również związek z eliminacją wirusa u pacjentów bezobjawowych w zakażeniu ostrym<sup>17</sup>. Innym predyktorem dobrej odpowiedzi na leczenie jest chemokina indukowana przez interferon  $\gamma$  (CXCL10 – IP-10, ang. *Interferon  $\gamma$  inducible protein 10*), który może być nieinwazyjnym biomarkerem włóknienia wątroby. Ostatnio opisano także znaczenie rokownicze przeciwciał neutralizujących anti-E1E2, a także polimorfizmu TT/ $\Delta$ G<sup>46</sup>.

W grupie pacjentów ze zdekompenowaną czynnością wątroby jedyną możliwością leczenia jest przeszczep wątroby. Jednak w trakcie oczekiwania na przeszczep i/lub okresie okołotransplantacyjnym istotne może być właściwe leczenie przeciwwirusowe, mogące zapobiec odrzuceniu przeszczepu z powodu reinfekcji narządu przeszczepionego. Niestety leczenie PegIFN-RBV jest źle tolerowane u chorych z dekompenzacją marskości wątroby<sup>48</sup>.

## 2.3. Immunopatogeneza zakażenia HCV

Wirus HCV nie jest wirusem o bezpośrednim działaniu cytotoksycznym. Obraz kliniczny zakażenia jest ściśle związany z procesami immunologicznymi, zachodzącymi równoległe z zakażeniem.

Obrona organizmu odbywa się w pierwszej kolejności dzięki istnieniu mechanizmów odporności wrodzonej, w tym barier anatomicznych, chemicznych, następnie przy udziale odpowiedzi nabytej.

Stan rozwojowy i funkcjonalny układu odpornościowego warunkuje w znacznym stopniu przebieg zakażenia HCV. Wiele objawów i powikłań PZWC jest uzależnionych od cytotoksycznego działania limfocytów, komórek NK, wpływu cytokin czy chemokin.

### 2.3.1. Charakterystyka odpowiedzi wrodzonej

Odpowiedź wrodzona jest istotnym elementem reakcji organizmu na obecność patogenu ze względu na kinetykę i szybkość działania. Odpowiedź mechanizmów efektorowych rozwija się bardzo szybko bez wstępnej aktywacji już po pierwszym kontakcie z patogenem/obcą substancją. Odpowiedź wrodzona nie pozostawia pamięci immunologicznej<sup>49</sup>, jest dziedziczona, jednak poziom jej aktywności zmienia się wraz ze starzeniem się organizmu<sup>50</sup>. Odpowiedź wrodzona najwcześniej w ewolucji wykształciła się u jamochłonów<sup>51</sup>.

#### 2.3.1.1. Elementy składowe odpowiedzi wrodzonej

Funkcje odpowiedzi wrodzonej układu immunologicznego określone są przez wytwarzanie cytokin (m.in. IFN, TNF, IL), chemokin (m.in. RANTES, MIP1a,b), układu dopełniacza, cząsteczek adhezyjnych, rodników tlenowych i tlenku azotu oraz poprzez komponentę komórkową<sup>49</sup>. Wśród składowych komórkowych odpowiedzi wrodzonej należy wyróżnić: granulocyty obojętnochłonne, zasadochłonne oraz kwasochłonne, mastocyty, monocyty, makrofagi, komórki naturalnej cytotoksyczności (ang. *natural killer cells*, *NK cells*). Wśród składowych humoralnych podaje się (m.in.): białka układu dopełniacza, cytokiny, białka ostrej fazy, lizozym i wiele innych.

W hepatologii na pierwszy plan spośród komórek uczestniczących w odpowiedzi wrodzonej wysuwają się komórki NK, NKT (limfocyty T wykazujące ekspresję markerów komórek NK), KC (komórki Kupffera), DC (komórki dendrytyczne), komórki wyściółki zatok LSEC<sup>49,52</sup>.

Charakterystyka komórek **NK** znajduje się w podrozdziale 2.3.1.3

Komórki **NKT**, należące do limfocytów T, wykazują ekspresję antygenów komórek NK, ale określa się je jako CD3+. Stanowią one 30% wewnątrzwątrobowych limfocytów T. Mogą wydzielać interferon- $\gamma$ , IL-4, 13, TNF, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów - GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) oraz limfotoksyny. Do ich rekrutacji dochodzi przez APC. Ich rola sprowadza się do działania przeciwbakteryjnego, przeciwwirusowego, przeciw pasożytniczego oraz przeciwnowotworowego<sup>53</sup>.

**Komórki Browicza-Kupffera** są zaliczane do makrofagów wątrobowych, które stanowią około 20% komórek pozamięszkowych wątroby. Ich wpływ na komórki NK polega na stymulowaniu ich poprzez IL-12 i 18 do wydzielania interferonu- $\gamma$ .<sup>54</sup>

Komórki żerne z pomocą czynników chemotaktycznych, cytokin prozapalnych, receptorów dla dopełniacza i dzięki receptorom rozpoznającym wzorce molekularne patogenów, fagocytują i neutralizują komórki zakażone, nowotworowe, uszkodzone<sup>55</sup>.

**Komórki dendrytyczne**, odmiana makrofagów, są najsprawniejszymi APC (ang. *Antygen Presenting Cells*) – komórkami prezentującymi antygeny limfocytom T. Mówi się o nich jako o łącznikach odpowiedzi wrodzonej i nabytej. Odgrywają znaczącą rolę w tolerancji immunologicznej<sup>56</sup>. Populację komórek DC dzieli się na linię mieloidalną (mDCs) i plazmocytową (pDCs). mDCs wydzielają IL-12 i 15; są istotne w sygnałowaniu komórek T o fenotypie CD4+ i CD8+, cytotoksycznych i specyficznych dla antygeny. Aktywują również komórki NK. pDCs natomiast pod wpływem antygeny wydzielają IFN typu I, który powoduje aktywację i ekspansję komórek NK. Tym samym komórki NK i DC ściśle ze sobą współpracują poprzez bezpośredni kontakt jak i pośrednio przez cytokiny<sup>4,57</sup>.

**Komórki Ito** – wątrobowe komórki gwiazdziste (ang. *Hepatic Stellate Cell* – HSC), magazynujące witaminę A, występują w przestrzeniach okołozatokowych wątroby. W warunkach patologicznych, jak w przypadku włóknienia wątroby, komórki Ito uwalniają witaminę A i produkują składniki macierzy pozakomórkowej (m.in. kolagen I i III)<sup>6,58</sup>.

**Komórki wyściółki zatok** stanowią około 50% pozamiąższowych komórek wątroby. Są barierą fizyczną jak i immunologiczną pomiędzy hepatocytami a krwią obwodową<sup>59</sup>.

### 2.3.1.2. Receptory odpowiedzi wrodzonej

Istotą działania odpowiedzi wrodzonej jest rozpoznawanie oraz neutralizacja drobnoustrojów, ale także wszystkich innych struktur obcych (ang. *nonsel*). Do ich identyfikacji wykorzystuje specyficzne wzorce molekularne związane z patogenami - PAMPs (ang. *Patogen Associated Molecular Patterns*). Główną rolę w tym rozpoznawaniu odgrywają receptory rozpoznające wzorce (ang. *Pattern Recognition Receptors - PRR*), a zwłaszcza receptory Toll-podobne (TLRs, ang. *Toll-like receptors*)<sup>55,60</sup>. Reakcja komórek efektorowych na PAMPs jest natychmiastowa i nie wymaga proliferacji w.w. komórek<sup>55</sup>.

Do receptorów rozpoznających wzorce zalicza się: NLRs, RLPs, TLRs. Te ostatnie znane są jako receptory konserwatywne, wstępnie rozpoznane u człowieka jako analogiczne z receptorami występującymi u muszki owocowej – *Drosophila melanogaster*, odpowiedzialne za wzrost podłużny muszki i działanie przeciwgrzybicze, znajdowane są przede wszystkim na powierzchni komórek. Występują u roślin, bezkręgowców jak i u kręgowców. Ich rola jest znacząca zarówno w procesach nowotworowych, procesach autoimmunizacyjnych jak i w zakażeniach. Receptory te stanowią główny element rozpoznawania i sygnałowania w odpowiedzi wrodzonej. U człowieka wyróżnia się min 11 TLR głównie o funkcji prozapalnej w zakażeniach bakteryjnych jak i wirusowych<sup>61,62</sup>. TLR aktywują sieć prozapalną, poprzez zwiększenie wydzielania IFN typu I, TNF  $\alpha$  czy IL-6. Mogą również hamować replikację wirusa w mechanizmie niezależnym od interferonu. W procesie sygnałowania w zakażeniach wirusowych znaczenie mają: TLR 2,3,4,7,8,9<sup>49,52</sup>. TLR 2-4, 7-9 odpowiadają za indukcję wydzielania interferonu- $\alpha$  i  $\beta$ , co skutkuje wzrostem ekspresji genów stymulowanych przez IFN (ISG, ang. *interferone stimulated gene*), dając w efekcie odpowiedź przeciwwirusową, antyproliferacyjną oraz immunoregulacyjną. Receptory Toll-podobne 3, 7, 8 i 9 obserwuje się w obrębie retikulum endoplazmatycznego w endosomach, lizosomach. Pozostałe TLR znajdują się natomiast w błonie komórkowej<sup>63,64</sup>.

Odpowiednikiem TLR4 jest myszy gen *Ips*, którego mutacja odpowiada za zwiększenie wrażliwości na bakterie Gram ujemne poprzez rozpoznanie lipopolisacharydu<sup>65</sup>.

Ponadto można zaobserwować częstsze występowanie konkretnych TLR w odpowiednich komórkach odpowiedzi wrodzonej; TLR 7 i 9 występują na powierzchni limfocytów B i pDC, TLR

8-monocytach i mDC, TLR 1-4,6-9 – KC, TLR 1-4, 6-8- LSEC. Co ciekawe aktywacja TLR 7 i 9 prowadzi do wytwarzania przeciwciał związanych z obecnością czynnika reumatoidalnego i krioglobulin<sup>52</sup>. W związku z czym proponowano zastosowanie agonistów TLR 7 i 9 w leczeniu PZW C<sup>66</sup>. Wśród innych receptorów odpowiedzi wrodzonej wyróżnia się receptory lektynowe, receptory zmiatacze (ang. *scavenger*) oraz receptory komórek NK<sup>49</sup>.

### 2.3.1.3. Komórki NK

Komórki NK stanowią pierwszą linię obrony odpowiedzi wrodzonej, sprawują nadzór immunologiczny<sup>67</sup>. Wywodzą się z komórek progenitorowych limfocytów, z macierzystych komórek szpiku. Komórki te są uważane za łącznik odpowiedzi wrodzonej i nabytej przez współdziałanie z komórkami dendrytycznymi, a także przez wydzielanie cytokin sygnałowych dla limfocytów<sup>68</sup>. Morfologicznie zaliczane są do grupy dużych ziarnistych limfocytów. Charakteryzuje je nerkowate jądro o średnicy 12-15 µm oraz obecność ziarnistości azurofilnych, które określają cytotoksyczność komórki.

Ogólny profil fenotypowy określają markery białkowe CD16, CD56, CD57. Jednocześnie nie obserwuje się białka CD3<sup>69</sup>. U człowieka dzieli się je również pod względem gęstości receptorów CD56. Komórki NK w populacji komórek krwi obwodowej stanowią około 10-15 % wszystkich limfocytów we krwi obwodowej<sup>70</sup>. Komórki NK można znaleźć w wielu tkankach, zarówno limfatycznych i nielimfatycznych; tj. m.in.: w szpiku kostnym, we krwi, w śledzionie, węzłach chłonnych wątrobie, płucach, grasicy, macicy, jamie otrzewnej itp.<sup>71</sup>.

Komórki NK w odróżnieniu od limfocytów T i B nie wykazują klonalnej dystrybucji receptorów, co oznacza, że w momencie ekspozycji na czynnik obcy nie dochodzi do namnażania się za pomocą podziałów mitotycznych wybranych komórek o swoistości dla danego antygeny<sup>72</sup>.

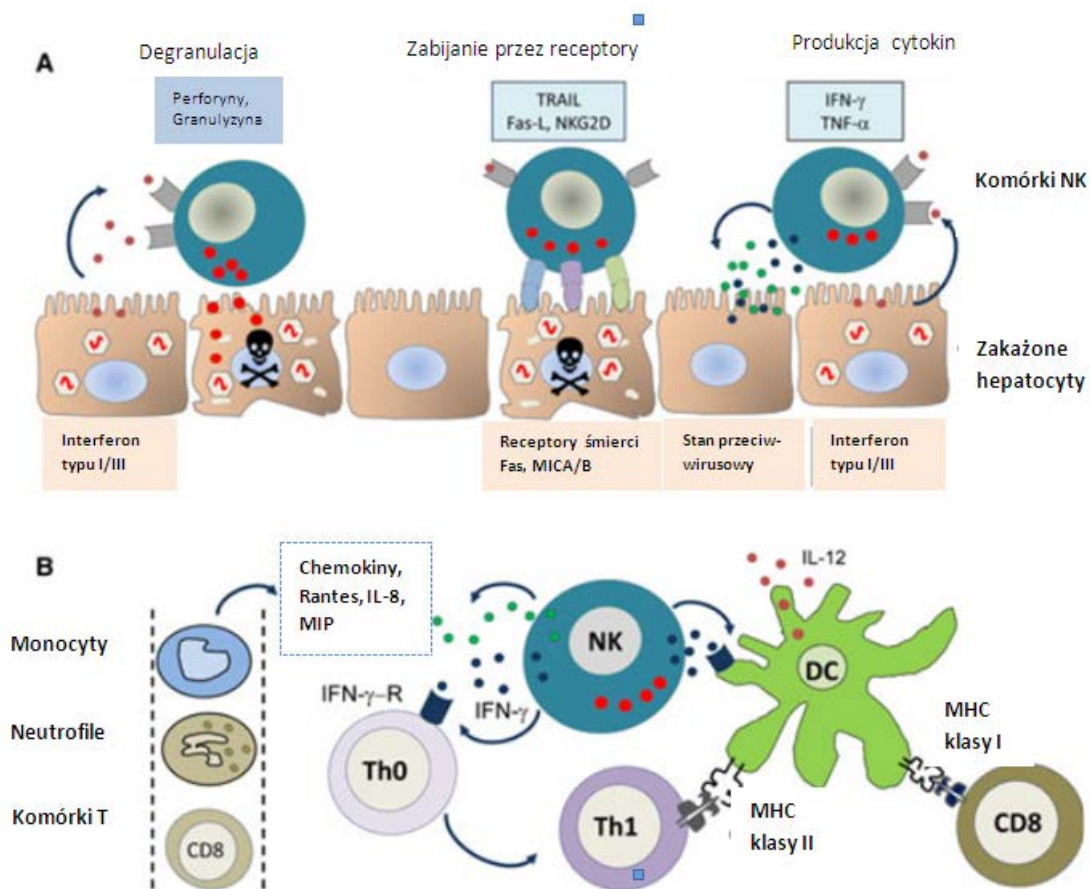
Komórki NK charakteryzują się szybką odpowiedzią odpornościową, przyczyniając się do szybkiej lizy wielorakich linii komórkowych w sposób niezależny od MHC<sup>73</sup>. Pochylając się nad tematem immunopatologii wątroby, należy tu nadmienić, że w warunkach homeostazy organizmu komórki wątrobowe wykazują jednak niską ekspresję antygenów MHC klasy I. Nie stwierdza się ponadto ekspresji antygenów klasy II<sup>74</sup>.

**Komórki NK wewnątrzwątrobowe** stanowią ponad 1/3 (31,6%) limfocytów wewnątrzwątrobowych<sup>4,75</sup>. W badaniach polskich komórki NK stanowiły 14,5% subpopulacji wewnątrzwątrobowych limfocytów i wyższy odsetek obserwowano przy większym zaawansowaniu

zmian zapalnych w biopsji wątroby. We krwi obwodowej u tych chorych komórki NK stanowiły zaś 10,5% <sup>76</sup>. Liczba wewnątrzwątrobowych NK spada w przewlekłym zakażeniu i ponownie obniża się przy progresji do marskości wątroby <sup>77</sup>. Wyniki są jednak rozbieżne. W opracowaniu Pernollet'a i wsp., gdzie komórki NK stanowiły 38% limfocytów w wątrobie zakażonej w porównaniu z 55% w wątrobie niezakażonej HCV. Podaje ono również, że brak jest pomiędzy tymi grupami różnicy w statusie aktywacji komórek NK na podstawie CD96 <sup>78</sup>. Komórki NK wewnątrzwątrobowe różnią się tym od krążących NK tym, że nie wykazują ekspresji CD16, wykazują zwiększoną ekspresję CD94:NKG2A i obniżenie ekspresji KIR <sup>79</sup>. Mimo, że w wątrobie odsetek komórek NK jest wysoki, są one hiporeaktywne ze względu na panujące tu „tolerogeniczne” środowisko.

#### **2.3.1.3.1. Mechanizm działania komórek NK i ich receptory**

Komórki NK działają cytotoksycznie uwalniając granzym i perforynę, poprzez interakcję z receptorami śmierci bezpośrednio oraz pośrednio poprzez cytokiny (interferon, TNF, IL-3, GCSF (czynnik stymulujący granulocytów), MCSF (-monocytów)), aktywację komórek dendrytycznych czy współdziałanie z limfocytami regulatorowymi T. IFN wydzielany przez komórki NK promuje rozwój swoistej odpowiedzi T – komórkowej <sup>4,80,81</sup>. Na Rycinie 11 przedstawiono schemat mechanizmu bezpośredniego i pośredniego działania komórek NK.



**Rycina 6 . Mechanizm działania komórek NK. A – mechanizm bezpośredni, B- pośredni. Opis w tekście. Na podstawie Golden-Mason, L. [4]- modyfikacja własna. Skróty: DC – komórki dendrytyczne, Th) – niedojrzałe komórki T pomocnicze, TRAIL – ligand indukujący apoptozę.**

Komórki NK rozpoznaje się za pomocą N-CAM (ang. *Neural Cell Adhesion Molecule* – cząsteczka adhezji komórek nerwowych), markera CD56. Funkcjonalnie różni się komórki NK o ekspresji  $CD56^{+dim}$  i  $CD56^{+bright}$ .  $CD56^{+bright}$  wykazują obecność receptorów NKG2A i brak KIR<sup>82</sup>. NK o ekspresji  $CD56^{+bright}$  jest funkcjonalnie niedojrzały, ma funkcję regulatorową. Odpowiada głównie za produkcję cytokin, może powodować wzrost komórek NK o ekspresji  $CD56^{+dim}$ . Komórki NK  $CD56^{+dim}$  mają funkcję efektorową, są dojrzałymi komórkami cytotolitycznymi o znacznej ekspresji perforyn, mają wyższą ekspresję receptorów KIR i FCγIIIR (CD16). Stanowią one większość komórek NK krążących we krwi obwodowej<sup>77</sup>. W naciekach wątrobowych vs. krew obwodowa stwierdzono NK o fenotypie  $CD56^{+dim}$  (o niskiej ekspresji), które stanowią 90% wszystkich komórek NK. Komórki  $CD56^{+bright}$  wydzielają interferon<sup>83</sup>. Istnieje także podtyp

komórek NK o ekspresji CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> które wykazują ostateczne zróżnicowanie; są jednak dysfunkcjonalne, ponieważ ich funkcja cytolityczna, jak i produkcja przez nie cytokin jest upośledzona<sup>4</sup>. CD3 jest natomiast markerem limfocytów T. Komórki NK nie wykazują ekspresji tego antygenu<sup>84</sup>.

Receptory komórek NK dzielimy na aktywujące i hamujące. Funkcja komórek NK regulowana jest aktywnością tych receptorów<sup>82</sup>. Wyróżnia się trzy główne grupy receptorów komórek NK:

- receptory KIR (ang. *killer immunoglobulin-like receptor*)
- receptory naturalnej cytotoxyczności (NCRs – ang. *natural cytotoxicity receptors*)
- receptory lektynopodobne typu C - NKG2/CD94 (ang. *natural killer group 2*).

W tabeli 4 zestawiono wybrane receptory komórek NK, należące do w/w grup głównych.

**Tabela 4. Receptory komórek NK.**

Grupa recept. NK	Receptor NK	Ligand
KIR	KIR2DS4 - CD158i	MHC - Cw4
	KIR2DL2 - CD158b	MHC – I gr C2A
NCRs	NKp30 – CD 337	BAT-3, pp65
	NKp44 – CD 336	Wirusowe hemaglutyniny
	NKp46 – CD335	Wirusowe hemaglutyniny
Receptory lektynopodobne typu C -CD94	NKG2C -CD159c	HLA-E
	NKG2E	HLA-E
	NKG2D - CD 314	MICA/B, ULBPs
	NKG2A	HLA-E

**Receptory KIR** są receptorami zarówno aktywującymi jak i hamującymi. Są to receptory polimorficzne, przezbłonowe, glikoproteiny.<sup>85</sup> Ze względu na liczbę zewnętrznych domen immunoglobulinowych podzielono je na dwie grupy: z dwiema domenami KIR2D i z trzema (KIR3D). Dalszy podział tych receptorów zależy od obecności ogona cytoplazmatycznego długiego z motywami ITIM (*immune tyrosine-based inhibitory motifs*),



warunkującego funkcję hamującą receptora lub krótkiego, odpowiedzialnego za funkcję aktywującą.

Receptory KIR występują na powierzchni komórek NK, na niektórych komórkach T, odpowiadają za rozwój, tolerancję immunologiczną i aktywację tych komórek <sup>86</sup>.

Występowanie poszczególnych genotypów KIR koreluje z chorobami takimi jak infekcje wirusowe, choroby autoimmunologiczne, zapalenie, nowotwory, stan przedrzucawkowy, aborcje spontaniczne <sup>87</sup>. Odbywa się to poprzez oddziaływanie z ligandami MHC-1, które mogą być markerami potencjalnej choroby <sup>4</sup>. Dotychczas wyodrębniono 16 genów KIR i pseudogenów, wyróżniono grupę A i B haplotypów, geny kodujące receptory hamujące i aktywujące <sup>88</sup>. Stwierdzono większą częstość haplotypu A w populacji koreańskiej, u rasy kaukaskiej – B (zarówno w grupie zakażonych HCV jak i w grupie kontrolnej) <sup>85</sup>. Ligandem dla tych receptorów jest HLA typu C. W pracy Sung P.S. obliczono częstość interakcji homozygotycznej z hamującym KIR (2DL2) i wyniosła ona w badanej populacji koreańskiej zakażonej HCV – 60%, podczas gdy częstości interakcji ligandem heterozygotycznym – C1C2 – 35%; w badaniu kontrolnym – odpowiednio 50% i 50% <sup>85</sup>. Interakcja KIR2DL2/HLAC1C2 wiązała się ze złą odpowiedzią na leczenie <sup>89</sup>.

Do receptorów aktywujących należą receptory naturalnej cytotoksyczności (NCRs). Wśród nich wyróżnia się receptory o sygnałowaniu aktywującym NKp46 (NCR1/CD335), NKp44 (NCR2/CD336), NKp30 (NCR3/CD337). Receptory NCR wykazują zagęszczenie na komórkach NK i korelują z ich aktywacją cytolityczną <sup>90</sup>. Te pierwsze, NKp46, są najbardziej specyficzne dla komórek NK. Brak NKp46 odpowiada za infekcje letalne. Sugeruje się, że receptor ten był ewolucyjnie pierwszym NCR zaangażowanym w rozpoznawanie patogenów i nowotworów. Wykazano również ich wpływ poprzez ligand na komórkach gwiazdzistych na protekcję wątroby przed jej włóknieniem <sup>4</sup>. NKp44 na stałe znajdują się na komórkach pDC i aktywowanych komórkach NK. Ligandem dla NKp30 są ligandy wirusowe: antygen pp65 cytomegalowirusa i hemaglutynina. Receptor NKp30 umożliwia również kontakt komórki NK z komórkami dendrytycznymi <sup>68</sup>. Obecność NKp30 i NKp46 wykazano zarówno na aktywowanych jak i spoczynkowych komórkach NK <sup>4</sup>.

Spośród receptorów NKG2 receptorami hamującymi są – NKG2A, NKG2B. Receptory **NKG2D** (CD314) występują na komórkach NK jak i limfocytów T cytotoksycznych; są specyficzne dla łańcucha polimorficznego zależnego od kompleksu atakującego błonę - MAC I

(ang. *Membrane Attack Complex*) indukowanego przez stres, który może być ekspozowany na komórkach zakażonych i transformowanych<sup>91</sup>. Wykazano działanie przeciwwirusowe NKG2D wobec wirusa CMV, HBV a nawet HIV<sup>4</sup>. NKG2A i NKG2D łączą się z HLA – E<sup>81</sup>.

Na powierzchni komórek NK występują również inne molekuły takie jak: DNAM, CD27, CRTAM, CD96, CD100, 319, PSGL1. Poza DNAM, który odpowiada za adhezję limfocytów i sygnalizację, wydaje się, że pozostałe cząstki nie wykazują istotnego wpływu na funkcję komórek NK<sup>82</sup>.

Na komórkach NK znajduje się również ligand aktywujący TNF związany z apoptozą – TRAIL (CD253). Odpowiada on za „zewnętrzną” indukcję śmierci komórki. Ligand ten zaangażowany jest w immunosupresję, immunoregulację i funkcje immunoefektorowe w odpowiedzi przeciwwirusowej<sup>4</sup>.

#### **2.3.1.3.2. Aktywacja komórek NK**

Jeśli NK ma kontakt z komórką bez MHC klasy I lub brak jest konstytutywnego hamowania przez zmniejszenie ekspresji (ang. *downregulation*) receptorów MHC - 1, dochodzi do aktywacji funkcji cytolitycznej komórki NK. Podobnie dzieje się pod wpływem sygnału stymulującego TLR czy interleukin, receptorów naturalnej cytotoxycności, NKG2D, C. Na komórkach NK zwiększa się jednocześnie ekspresja receptorów aktywujących, przylegają one do komórek docelowych i wydzielane są cytokiny prozapalne (interferon, Il-2, 12, 15).

Okazuje się, że dominacja receptorów hamujących w połączeniu z odpowiadającym im ligandem może zaburzać funkcję komórek NK i promować progresję procesu chorobowego<sup>85</sup>.

#### **2.3.2. Metody oceny immunofenotypu komórek biorących udział w reakcjach immunologicznych, w tym komórek NK**

Z uwagi na fakt, iż praca dotyczy komórkowej odpowiedzi immunologicznej w obecności zakażenia wirusowego, w podrozdziale diagnostyka opisano metody immunofenotypowe.

Metody te opierają się na analizie immunofenotypu komórki, czyli zbioru charakterystycznych antygenów danej komórki, świadczącej o jej strukturze, funkcji. Pod wpływem zmian w genomie, np. wskutek zakażeń wirusowych czy rozrostów nowotworowych, fenotyp, który jest odzwierciedleniem genotypu, zmienia się. Do analizy tych zmian służy cytofluorymetria przepływowa. W badaniu tym wykorzystuje się antygen – żywe, nieutrwalone komórki w zawiesinie, przeciwciała znakowane fluorochromami oraz cytofluorymetr przepływowy sterowany komputerem. Do oceny immunofenotypowej można użyć materiałów biologicznych takich jak: krew, szpik kostny, płyn mózgowo-rdzeniowy, wysięk z jam ciała, komórki izolowane z węzłów chłonnych, materiał biopsyjny z gastrokopii i biopsji narządowych. Komórki krwi nadają się do oceny przez 8-12 h (ew. 24) zabezpieczone przed wzrostem temperatury. Do oceny niezbędne są dane kliniczne pacjenta, rozmaz krwi, leukocytoza. Materiał zakaźny musi być pobierany z zachowaniem zasad aseptyki, szczelnie zamknięty i oznakowany.

Metoda cytometrii przepływowej polega na wykorzystaniu pomiaru rozpraszania wiązki światła lub fluorescencji cząsteczek/ komórki badane za pomocą minimum dwóch detektorów (rozproszenie przednie – *forward scatter*; rozproszenie boczne – *side scatter*). Pozwala to na analizę jakościową i ilościową analizowanych komórek. Każda cząsteczka pokryta jest przeciwciałami dla badanego białka (antygeny). Ma ona ściśle określoną wielkość i tym samym ściśle określone rozproszenie światła emitowanego. Antygen opłaszczany jest przeciwciałami detektorowymi znakowanymi fluorochromem, co zapewnia fluorescencję i ocenę MFI (średnia intensywność fluorescencji), mówiącą o gęstości molekuł antygeny badanej komórki. Tak przygotowany preparat jest badany za pomocą cytofluorymetru przepływowego, wyniki są analizowane komputerowo za pomocą specjalistycznego oprogramowania, a następnie obrazowane za pomocą wykresów jedno-, dwu- i trójwymiarowych. Analiza kwadrantowa zapewnia ocenę ekspresji determinant.

Jest to metoda obiektywna i powtarzalna, umożliwiająca ocenę wielu parametrów w stosunkowo krótkim czasie. Jedynymi wadami tej metody jest brak obrazowania rzeczywistego danych obiektów, brak możliwości odróżniania przez cytofluorymetr komórek od artefaktów (o podobnych parametrach), co może dawać błędny odczyt w przypadku wadliwego preparatu, kolejnym ograniczeniem jest świeżość badanego materiału .

Współczesna medycyna znajduje wiele zastosowań oceny cytometrycznej. Są to m.in.: diagnostyka niedoborów odporności, chorób autoimmunizacyjnych, chorób z nadwrażliwości, chorób nowotworowych układu krwiotwórczego; ocena transplantologiczna; cytogenetyka. Oprócz diagnostyki cytometria przepływowa wykorzystywana jest w monitorowaniu terapii<sup>92</sup>.

## 2.4. Interakcje wirusa HCV z komórkami odpowiedzi wrodzonej gospodarza

Po ekspozycji na zakażenie HCV już w pierwszych 2 tygodniach aktywowana jest odpowiedź wrodzona<sup>52</sup>. Aktywacja odpowiedzi wrodzonej przeciwko wirusowi HCV zachodzi poprzez TLR i drugi szlak wykorzystujący helikazę RNA kwau retinoidowego indukujący gen I (RIG-1) jako receptora dla wewnątrzkomórkowego dsRNA i aktywacji czynników transkrypcyjnych. Białko rdzenia w formie monomeru pobudza drogę TLR-2 wspomagając maskowanie się wirusa przed odpowiedzią wrodzoną. NS3/4A zaburza sygnałowanie TLR-3 i RIG-1, NS5A – obniża NKG2D na komórkach NK poprzez TLR-4<sup>60,61</sup>.

Podobne interakcje z PRR odkryto dla białka NS5A, które poprzez TLR4 obniża ekspresję NKG2D na komórkach NK poprzez wzrost sekrecji TGFβ. Interakcja ta wpływa również na zwiększone wydzielanie Il-6, IFNβ i Il-10 oraz na supresję wydzielania Il-12. NS3/4A natomiast zaburza głównie sygnałowanie ścieżek TLR3 i RIG-1, które nie są aktywne do czasu właściwej produkcji dsRNA<sup>93</sup>. Powyższe interakcje zamieszczono w Tabeli 5. oraz na Rycinie 10.

**Tabela 5. Interakcje białek wirusa HCV z receptorami rozpoznającymi wzorce PRR. Na podstawie Imran, M. (61) – modyfikacja własna.**

HCV białko	PRR
Białko rdzeniowe	TLR 2
NS3/4a	TLR3, RIG 1, TLR 2
NS5A	TLR4

Białko rdzeniowe → TLR2 → IL6 → APC (ograniczona zdolność różnicowania TH17) → TH17

↓  
IL10, TNFα  
↓  
↓TNFα  
przez TLR9

NS5A → IL10 → TGFβ → ↓NKG2D → zaburzenie funkcji komórek NK

Chorzy zakażeni HCV mają zwiększoną wrażliwość na różne choroby infekcyjne ze względu na rozchwianie aktywacji sygnałowania TLR<sup>94</sup>.

Komórki NK z receptorem dla chemokin - CXCR3<sup>+</sup>CD56<sup>+bright</sup> mają właściwości antyfibrotyczne. Dysregulację ich funkcji obserwuje się u osób chorych. U myszy komórki te zabijają komórki gwiazdziste. Chemokiny z motywem CC są chemotaktyczne dla komórek T, monocytów, a także dla komórek NK. Należy tu wymienić chemokinę RANTES (CCL5) indukującą chemotaksję eozynofików, ale także komórek NK.

Również wewnątrzwątrobowe komórki NK o fenotypie CXCR3<sup>+</sup> CD56<sup>+bright</sup> korelowały ze stanem włóknienia (zwiększona kumulacja tych komórek w wątrobie w zaawansowanym włóknieniu). W PZWC stwierdza się upośledzenie degranulacji tych komórek NK i upośledzenie wydzielania IFN- $\gamma$  (w odpowiedzi na komórki gwiazdziste) przy zwiększonej częstości tego fenotypu.

Większość limfocytów w wątrobach osób zakażonych HCV wykazuje ekspresję CXCR3 przede wszystkim na limfocytach T ale również na komórkach NK. Częstość CXCR3<sup>+</sup> jest częstsza w subpopulacji NK CD56<sup>+bright</sup>. Na tych komórkach znacząco wzrasta ko ekspresja receptorów NKG2A, 2C i NKp44.

W modelu zwierzęcym zabijanie komórek gwiazdzistych przez komórki NK jest uczynnione poprzez receptory NKG2D. *Eisenhardt i wsp.*, podaje, że blokowanie receptorów NKG2D zmniejsza znacząco degranulację NK i wydzielanie IFN- $\gamma$  po koinkubacji z komórkami gwiazdzistymi. W związku z tym zmniejszona ekspresja NKG2D w *hepatitis C* może być odpowiedzią na dysregulację odpowiedzi NK na HSC. Niektórzy autorzy mówią jednak o jego zwiększonej ekspresji<sup>95</sup>.

#### **2.4.1. Faza zakażenia, obrona przed zakażeniem**

Komórki NK są zaangażowane na każdym etapie zakażenia. Okazuje się, że komórki NK mogą chronić hepatocyty już przed ich zakażeniem<sup>4</sup>.

U pacjentów, którzy mimo narażenia na zakażenie HCV pozostawali zdrowi obserwowano wzrost komórek NK CD56<sup>low</sup>, wzrost IL-2, a także wzrost cytotoksyczności przeciwko komórkom linii K562 oraz wzrost NKp30. Wykazano, że wzrost NKp46 i NKp30 na komórkach NK koreluje z ochroną komórki przed zakażeniem wirusowym. Dodatkowo ekspresja NKp46 była zależna od płci i rasy osób badanych.<sup>96</sup>

Prawdopodobnie przyczyną delecji komórek NK jest brak IL-15, która w warunkach zdrowia jest wydzielana przez komórki DC. Skutkuje to zmniejszeniem produkcji endogenego IFN- $\gamma$ <sup>97</sup>.

#### **2.4.2. Ostre zapalenie wątroby typu C**

**W okresie ostrego zakażenia HCV** dochodzi do dysregulacji funkcji, liczebności, aktywacji subpopulacji komórek NK, do wzrostu ich cytotoksyczności, produkcji IFN $\gamma$  przez nie i degranulacji komórek NK u chorych w stosunku do liczby aktywności komórek NK u osób zdrowych<sup>98</sup>.

Wg Corrado jednak w trakcie infekcji HCV dochodzi do upośledzenia cytotoksyczności komórek obwodowych NK<sup>99</sup>. Liczba komórek NK u osób zakażonych jest większa w utkaniu wątroby niż we krwi obwodowej<sup>4,81</sup>. Mimo to odsetek krążących komórek NK w okresie ostrego zakażenia rośnie w porównaniu z ich odsetkiem w stanie zdrowia. Zważywszy na fakt, że odpowiedź wrodzona jest odpowiedzią szybszą od nabytej, obserwuje się wyprzedzenie aktywacji komórek NK przed limfocytami T<sup>4</sup>. Istotny jest wzrost odsetka komórek NK o ekspresji receptora NKG2D i spadek odsetka komórek o ekspresji NKp30 i NKp46 i koreluje to z klirensem HCV<sup>100</sup>.

U osób, które zwalczyły infekcję, opisuje się spadek ekspresji receptorów naturalnej cytotoksyczności (NCRs) wyrażony poprzez spadek odsetka komórek NK o ekspresji NKp46 i NKp30<sup>100</sup>. Odpowiedź nieswoista w okresie ostrym zakażenia może odpowiadać za znaczną redukcję wirerii.

### 2.4.3. Zakażenie przewlekłe HCV

#### 2.4.3.1. Rola komórek NK

W trakcie przewlekłego zakażenia liczba komórek NK we krwi obwodowej zmniejsza się w stosunku do tego parametru obserwowanego wśród osób zdrowych.<sup>82</sup> Liczba wewnątrzwątrobowych NK w przewlekłym zakażeniu również spada i ponownie obniża się przy progresji do marskości wątroby<sup>77</sup>. Według opracowania Pernollet'a i wsp., komórki NK stanowią 38% limfocytów w wątrobie zakażonej w porównaniu z 55% w wątrobie niezakażonej HCV. Podaje ono również, że brak jest pomiędzy tymi grupami różnicy w statusie aktywacji komórek NK na podstawie CD96<sup>78</sup>.

Zmniejsza się ekspresja CD56<sup>dim</sup> i / lub zwiększa się ekspresja CD56<sup>bright</sup>; Możliwe, że jest to spowodowane tym, że komórki NK o fenotypie CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup> są bardziej podatne na apoptozę w porównaniu do komórek CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>. Poza tym obserwuje się wzrost NK o ekspresji CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup><sup>77, 4</sup>.

Dochodzi również do zwiększenia cytotoksyczności komórek NK poprzez TRAIL (ang. *TNF factor related apoptosis – inducing ligand*), który w warunkach *in situ* powoduje zniszczenie hepatocytów; proces ten wzmacnia niewystarczająca produkcja interferonu<sup>4,97</sup>.

Ekspresja poszczególnych receptorów komórek NK w trakcie zakażenia przewlekłego HCV pozostaje niepewna, w wielu opracowaniach zamieszczone są sprzeczne informacje. Szczególnie w zakresie ekspresji receptorów NCR<sup>4</sup>.

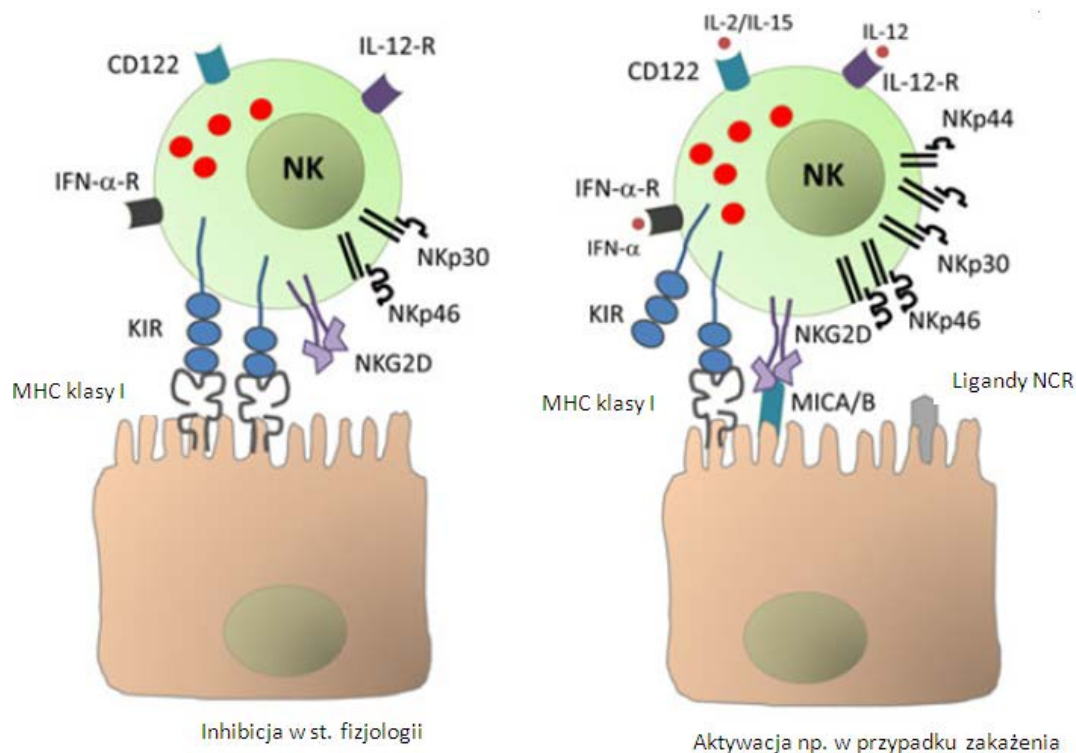
Według badań przeprowadzonych przez Kramer'a i wsp., komórki NK o wysokiej ekspresji NKp46 wykazują znaczną aktywność cytotoxiczną i wyższą sekrecję IFN $\gamma$  niż komórki o ekspresji NKp46<sup>dim</sup>. Te pierwsze ponadto efektywniej hamują replikację wirusa *in vitro*. Częstość NKp46<sup>High</sup> koreluje odwrotnie proporcjonalnie do poziomu HCV-RNA i stadium włóknienia wątroby.

Wzrost ekspresji NKG2A tłumaczy się faktem hamowania funkcji komórek NK albo wzrostem odsetka komórek CD56<sup>bright</sup>, które to wykazują zwiększoną ekspresję NKG2A<sup>4</sup>. Zwiększona ekspresja receptorów NKG2A koreluje odwrotnie proporcjonalnie do wirēmii<sup>81</sup>.

Wskazuje się także na znaczącą rolę NKG2D w obronie przeciwwirusowej, ale nie wyjaśniono w jaki sposób do tego dochodzi. Jedna z teorii mówi, że zakażony hepatocyt w kontakcie z komórką NK upośledza jej funkcję i to zahamowanie jest związane ze zmniejszeniem ekspresji NKG2D, NKp30 na tych komórkach. Może mieć to wpływ na stabilizację procesu przewlekłego<sup>4,101</sup>.

Spadek wydzielania IFN $\gamma$  i wzrost cytotoxyczności komórek NK może mieć wpływ na uszkodzenie wątroby i przetrwanie wirusa, a nawet wzrost jego replikacji, ponieważ brak jest bezpośredniego hamowania namnażania się wirusa<sup>102</sup>.

Na Rycinie 12 przedstawiono proces aktywacji i inhibicji komórek NK<sup>4</sup>.



**Rycina 7. Aktywacja i inhibicja komórek NK - uczestniczące w tym procesie receptory i ligandy. Na podstawie Golden-Mason, L. (4) – modyfikacja własna.**

#### 2.4.3.2. Rola wirusa HCV

Wirus HCV może mieć wpływ na upośledzenie mechanizmów odpornościowych u zakażonych. Również sam fakt przewlekłości procesu chorobowego może wskazywać na zaburzenia regulacji mechanizmów immunologicznych w stronę hamowania jej odpowiedzi.

Białko rdzeniowe HCV wpływa na zwiększenie ekspresji molekuł MHC klasy I, które są ligandami dla hamujących KIR, przez co dochodzi do zmniejszenia cytotoxyczności komórek NK przeciwko hepatocytom zainfekowanym wirusem HCV. Proces ten wskazuje na drogę uniku wirusa przed rozpoznaniem go przez komórki NK i stabilizację przewlekłości zakażenia<sup>64</sup>. Białko rdzenia jak i proteaza NS3 wyciszają działanie odpowiedzi immunologicznej przez zwiększenie produkcji



IL-10<sup>103</sup>. Ruggieri podaje jednak, że komórki zakażone HCV z ekspresją białek rdzeniowych mają skłonność do apoptozy niezależnie od aktywacji Fas<sup>104</sup>.

Białka otoczki wirusa – E1, E2 wpływają dodatkowo na zahamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych. Poza tym białko E2 hamuje działanie IFN- $\alpha$  i komórek NK<sup>105</sup>.

Wzrost aktywności proteazy NS3/4A odpowiada za zmniejszenie liczby receptorów aktywujących komórki NK – NKG2D, ligandów MICA i MICB<sup>4</sup>. Proteaza NS3/4A inaktywuje dwie molekuly sygnałowe – PAMPs i Toll-IL-1R (ang. *Toll/interleukin-1 receptor*), ale pomimo tego uniku wirusa odpowiedź wrodzona uruchamiana jest od pierwszego dnia infekcji, podczas gdy specyficzne dla zakażenia komórki T są rekrutowane w wątrobie dopiero po upływie 4-8 tygodni od zakażenia<sup>106</sup>.

Inna proteaza – NS5A stymuluje monocyty przez TLR4 do wydzielania Il-10, następnie do produkcji TGF- $\beta$ , co z kolei wpływa na spadek ekspresji NKG2D komórek NK i zwiększenie aktywności komórek HSC, tym samym promując włóknienie wątroby z uwagi na pobudzenie wzrostu fibroblastów<sup>6</sup>. Poza tym zwiększona produkcja TGF- $\beta$  wpływa na zmniejszenie cytotoksyczności NK poprzez upośledzenie wydzielania IFN $\gamma$  i degranulacji komórek o ekspresji CD107a<sup>4</sup>.

W infekcji HCV obserwuje się upośledzenie ekspresji MIC – A/B, co skutkuje mniejszym poziomem aktywacji komórek NK poprzez ligand dla NKG2D. Poza tym wzrasta ekspresja receptora NKG2A, który jest ligandem HLA-E, gdyż HCV może zwiększać ekspresję HLA-E<sup>4</sup>, co może mieć istotne znaczenie dla regulacji odpowiedzi wrodzonej<sup>81</sup>.

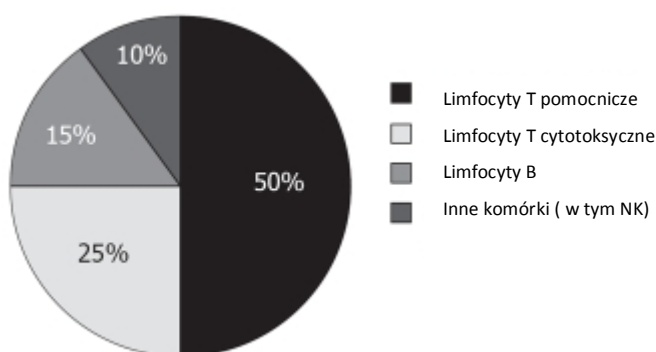
#### **2.4.4. Zmiany histopatologiczne a immunologia**

##### **2.4.4.1. Skład nacieku zapalnego**

W naciekach zapalnych w wątrobie u pacjentów z zakażeniem HCV (podobnie zresztą jak w przypadku zakażenia HBV) przede wszystkim obserwuje się znaczący udział komórek odpowiedzi swoistej, t.j. około 50-60% komórek T pomocniczych (*T helper lymphocytes*). Około 25% stanowią limfocyty T cytotoksyczne; 15% - limfocyty B. Inne komórki (w tym komórki NK) stanowią około 10%<sup>107</sup>. W związku z czym główną rolę w patogenezie przewlekłego zakażenia wirusem C przypisuje się jednak odpowiedzi swoistej. Na Rycinie 13 zamieszczono procentowy udział poszczególnych fenotypów limfocytów w nacieku zapalnym u chorych z przewlekłym zakażeniem.

Obecność grudek chłonnych koreluje z aktywnością procesu zapalnego toczącego się w wątrobie <sup>107</sup>. Nacieki z limfocytów B i T oraz makrofagów stwierdza się w przestrzeniach bramnych. Na pograniczu przestrzeni bramnych i tkanki mięszkowej powstaje martwice kęsowa, zaś w obrębie zrazików rozpoznaje się ogniska apoptozy i martwicy.

W badaniach histopatologicznych wykazano, że w preparatach od osób zakażonych wirusem C wątrobowe komórki NK są zlokalizowane w miejscach nekrozy, czego nie zaobserwowano w przypadku infekcji HBV <sup>77</sup>. Uważa się, że przewaga ekspresji receptorów hamujących komórek NK może być związana z wyższym stopniem uszkodzenia wątroby <sup>108</sup>.



**Rycina 8. Naciek zapalny w PZWB I C – na podstawie Walewska-Zielecka B. <sup>107</sup> - interpretacja własna.**

#### 2.4.4.2. Włóknienie wątroby

Przewlekłe zakażenie prowadzi do włóknienia wątroby. Jest to spowodowane aktywnością komórek cytotoksycznych T jak i komórek NK.

W warunkach homeostazy organizmu funkcja antyfibrotyczna komórek NK jest zależna od receptorów hamujących komórek NK, które wpływają na hamowanie aktywowanych wątrobowych komórek gwiaździstych - HSC <sup>4</sup>.

Komórki NK mogą indukować apoptozę komórek HSC drogą NKG2D zależną i TRAIL jak i bezpośrednio przez  $IFN\gamma$  <sup>4,109</sup>. W badaniu przeprowadzonym przez Muhanna i wsp, wykorzystano do wyciszenia funkcji genu iKIR (genu receptorów KIR hamujących) siRNA (ang. *small interfering RNA*) w hodowli komórek NK jak *in vivo* w modelu zwierzęcym, co daje obiecujące wizje na przyszłość leczenia włóknienia wątroby z użyciem siRNA dla konkretnych receptorów komórek NK, które mogą być modulowane *ex vivo* i wykorzystywane w terapii <sup>110</sup>. Proteaza wirusa HCV -

NS5A wpływa na spadek ekspresji NKG2D komórek NK i zwiększenie aktywności komórek HSC<sup>4,111</sup>.

Czynniki takie jak TGFβ, alkohol, mogą osłabiać cytotoksyczność komórek NK przeciwko HSC poprzez upośledzenie wydzielania IFNγ i degranulacji komórek o ekspresji CD107a, tym samym osłabiać właściwości antyfibrotyczne komórek NK<sup>4</sup>.

#### 2.4.5. Wpływ leczenia na procesy immunologiczne

##### Wpływ leczenia pegylovanym interferonem z rybawiryną na limfocyty obwodowe oraz wewnątrzwątrobowe.

U pacjentów osiągających RVR częstość aktywowanych komórek NK (CD69+) jest zwiększona<sup>112</sup>. W 12 tygodniu leczenia u chorych, którzy pozytywnie zareagowali na leczenie obserwuje się wzrost komórek T CD4+ (już po pierwszych dawkach, znamienne wzrasta w 12 tyg. leczenia), natomiast w zakresie komórek T CD8+ dokonuje się spadek ich liczby lub dochodzi do ich negatywizacji; w biopsji wątroby zaś liczba komórek CD8+ rośnie. W naciekach wątrobowych dominują komórki CD4+ i komórki NK, przewyższając one liczbę tych komórek znajdujących we krwi obwodowej. Nie odnotowano bezpośredniego działania cytopatycznego wirusa w stosunku do hepatocytów, co jednoznacznie wskazuje na mechanizm immunologiczny uszkodzenia komórek wątrobowych. Funkcja ta spełniana jest dzięki komórkom cytotoksycznym T CD8+, za pomocą granzymu A i B, perforyn, układu Fas ligand na powierzchni limfocytów, mechanizmów apoptozy zależnych od Fas lub indukowanej alternatywnie poprzez działanie interferonu alfa, który jest produkowany przez limfocyty CD8+. Zastanawia fakt, dlaczego ten sam schemat leczenia u różnych osób powoduje różne reakcje od eradykacji poprzez eliminację wirusa aż do braku odpowiedzi z potęgowaniem działań ubocznych<sup>83</sup>.

Pod wpływem skutecznej terapii ogólna liczba komórek NK wzrasta. W biopsjach osób, które uzyskały SVR (niezależnie od tego czy leczono samym interferonem czy interferonem z rybawiryną), widoczny jest wzrost wewnątrzwątrobowych komórek NK<sup>113</sup>. Komórki NK są jednymi z pierwszych komórek reagujących na terapię interferonem α. Potwierdza to ścisły związek komórek NK z odpowiedzią przeciwwirusową<sup>4</sup>. U pacjentów uzyskujących SVR wzrasta podstawowa częstość komórek NK CD56<sup>dim</sup>/CD16+ i zawartość perforyn. Wzrasta również naturalna i zależna od przeciwciał cytotoksyczność<sup>112</sup>.

Komórki NK w obecności wirusa wydzielają relatywnie mało IFN- $\gamma$ .<sup>81</sup> Mimo to podkreśla się, że jego działanie jest skuteczniejsze niż działanie cytotoksyczne komórek NK. Tłumaczy się to oddziaływaniem pojedynczej komórki NK wobec komórki zakażonej, podczas gdy IFN wydzielany przez tylko jedną komórkę działa na 100 komórek zakażonych<sup>97</sup>. IFN- $\gamma$  (IFN klasy II) wytwarzany jest przez komórki NK i NKT oraz przez specyficzne limfocyty T<sup>106</sup>.

U chorych zakażonych genotypem 1b wirusa HCV, leczonych pegylowanym interferonem z rybawiryną niska ekspresja TLR (w szczególności TLR3) korelowała z dobrą odpowiedzią na leczenie. Poza tym zaobserwowano wzrost ekspresji TLR 4,6,9 u osób osiągających SVR<sup>60</sup>.

Genetyczny wariant bliski IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) jest silnie związany ze spontanicznym klirensiem HCV i odpowiedzią na leczenie pegylowanym interferonem- $\alpha$  z rybawiryną<sup>106</sup>. Homozygotyczność IL-28B rs12979860 CC jest istotnie związana z SVR niezależnie od fenotypu komórek NK i ich funkcji<sup>112</sup>.

Ponadto obserwuje się spontaniczną rezolucję zakażenia, gdy dochodzi do połączenia KIR2DL3 z ligandem HLA-C grupy I. Według piśmiennictwa ekspresja receptorów KIR u chorych nie zmienia się lub jest obniżona<sup>81</sup>.

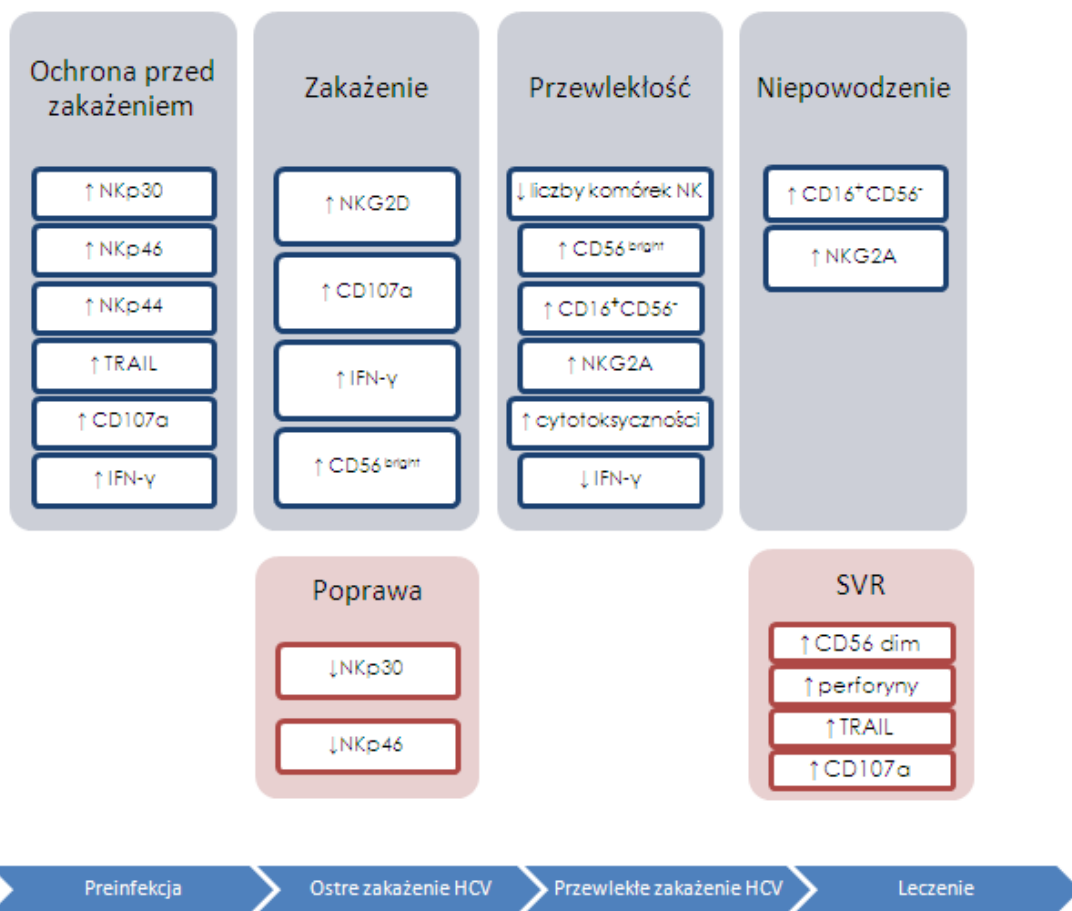
Występowanie komórek NKG2A dodatnich jest związane z lepszą odpowiedzią na terapię. Wzrost ekspresji receptorów NKG2A jedynie we wczesnej fazie zakażenia wpływa na osiągnięcie SVR<sup>114</sup>.

Po leczeniu natomiast dochodzi do zjawiska spadku ekspresji receptorów NKG2A na komórkach NK CD56<sup>dim</sup><sup>81</sup>. Dodatkowo IFN- $\alpha$  (zarówno ten endogenny jak i egzogenny) wpływa na obniżenie komórek o ekspresji CD56<sup>dim</sup> i wzrost CD56<sup>bright</sup><sup>97</sup>. Wzrost krążących komórek o ekspresji CD56<sup>-</sup> stwierdza się w przewlekłym zakażeniu, a ich najwyższe wartości notuje się u osób, które nie odpowiedziały na terapię. Korelacja ta jest szczególnie widoczna w przeciągu pierwszych 28 dni leczenia, kiedy to spadek ładunku wirusowego plasuje się poniżej 1,4 log<sub>10</sub>. Wzrost poziomu komórek CD56<sup>-</sup> koreluje w tym okresie ze słabszą odpowiedzią na leczenie<sup>114</sup>.

Pacjenci odpowiadający na terapię mają zwiększoną aktywność TRAIL na komórkach NK CD56<sup>dim</sup> (choć występują również na komórkach bright). Ekspresja TRAIL koreluje z SVR<sup>81,97</sup>. IFN $\alpha$  natomiast wpływa na ekspresję TRAIL na komórkach NK<sup>4</sup>.

Ci pacjenci, którzy dzięki skutecznej terapii mają prawidłową liczbę komórek NK, rzadziej doświadczają nawrotu choroby w stosunku do tych z deficytem komórek NK<sup>115</sup>.

W celu podsumowania powyższych rozważań, na Rycinie 14 przedstawiono udział komórek NK, poszczególnych receptorów komórek NK i wydzielania IFN na poszczególnych etapach zakażenia HCV.



**Rycina 9. Rola komórek NK na poszczególnych etapach zakażenia HCV. Opracowanie własne według Golden-Mason, L. [4]**

### **3. Cel pracy**

1. Głównym celem pracy jest znalezienie korelacji pomiędzy fenotypem komórek NK a stanem klinicznym zakażonych HCV.
2. Poszukiwanie różnic jakościowych i/lub ilościowych receptorów na komórkach NK pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi.
3. Poszukiwanie czynników klinicznych, modyfikujących ekspresję antygenów powierzchniowych na komórkach NK w obecności zakażenia wirusem HCV.

## 4. Pacjenci, materiał i metody

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała Komisji Bioetycznej nr 251/12 z dnia 1 marca 2012 r.).

### 4.1. Pacjenci

Do badania zakwalifikowano 98 osób, obu płci (♂ - 56, ♀ - 42) w wieku od 20 roku życia do 67 roku życia (średnia  $41,88 \pm 13,90$ ), z PZWC. Rozpoznanie choroby zostało potwierdzone wykazaniem obecności przeciwciał anty-HCV oraz materiału genetycznego wirusa - HCV-RNA w surowicy krwi oraz zmian zapalnych w badaniu histopatologicznym. Wszyscy chorzy byli hospitalizowani w Klinice Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z powodu diagnostyki hepatologicznej i/lub rozpoczęcia terapii w przebiegu zakażenia HCV. Pacjenci, którzy zostali zakwalifikowani do badania zostali poinformowani o celach badania i wyrazili zgodę na udział.

Grupę kontrolną stanowiły osoby niezakażone HCV ( $n=13$ ) obu płci (♂ - 8, ♀ - 5), w wieku od 31 do 52 roku życia (średnia  $39,77 \pm 7,17$ ) będące wolontariuszami pracującymi na terenie kliniki. Zakażenie innymi wirusami hepatotropowymi wykluczono w oparciu o badanie serologiczne.

Poniżej podano warunki wykluczające z badania:

- Wiek poniżej 18 roku życia
- Inne choroby wątroby, w tym choroby autoimmunizacyjne i nowotworowe
- Ostre wirusowe zapalenie wątroby
- Przebiecie leczenia preparatami interferonu i rybawiryny
- Współistnienie zakażenia innym wirusem hepatotropowym niż HCV.

U wszystkich chorych przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe. Wzięto pod uwagę następujące dane kliniczne:

- wiek i płeć,
- wiek w momencie rozpoznania zakażenia HCV, czas trwania oraz przebieg choroby w tym powikłania, aktualnie zgłaszane dolegliwości,

- choroby przebyte i współistniejące,
- przebyte zabiegi operacyjne w kontekście potencjalnego momentu zakażenia,
- wywiad rodzinny.

Krew została pobrana w grupie chorych przed rozpoczęciem leczenia oraz w grupie kontrolnej.

Biopsja wątroby przeprowadzona została u 76 pacjentów przed rozpoczęciem leczenia przeciwwirusowego.

## **4.2. Materiał i metody**

W trakcie hospitalizacji w Klinice Chorób Zakaźnych w Poznaniu w grupie osób zakażonych HCV pobrano krew na badania: immunologiczne (cytometryczne), morfologiczne, biochemiczne oraz wirusologiczne. W grupie kontrolnej przeprowadzono badanie morfologii krwi oraz badanie cytometryczne.

Krew do badań została pobrana z żyły łokciowej (5 ml) do probówek: z EDTA (morfologia, cytometria przepływowa). Materiał opracowano pod kątem immunologicznym w ciągu 6-12 godzin od pobrania.

### **4.2.1. Badania laboratoryjne**

Badania morfologii krwi obwodowej, badania biochemiczne oraz badanie wirusologiczne wykonano przy użyciu standardowych analizatorów laboratoryjnych w Laboratorium Oddziału Zakaźnego.

Analizie poddano następujące parametry:

- immunologiczne
  - cytometria przepływowa
- morfologia krwi obwodowej
  - leukocyty (WBC)
  - limfocyty
- badania biochemiczne
  - aminotransferaza alaninowa (ALT)



- aminotransferaza asparaginowa (AST)
- bilirubina (BIL)
- $\alpha$ -fetoproteina (AFP)
- wirusologiczne
  - badanie PCR metodą ilościową

Wartości referencyjne powyższych parametrów zamieszczono w tabeli 6.

**Tabela 6. Wartości referencyjne wykonanych badań laboratoryjnych.**

Parametr	Norma
Leukocyty (WBC) [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]	3,5 – 11,0
Limfocyty (LYMPH) [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]	1,0 - 3,5
Aminotransferaza alaninowa (ALT) [U/l]	<40
Aminotransferaza asparaginowa (AST) [U/l]	<45
Bilirubina (BIL) [mg/dl]	0,2 – 1,0
$\gamma$ -glutamylotranspeptydaza (GGTP) [U/l]	kobiety<35, mężczyźni <50
$\alpha$ -fetoproteina (AFP) [ng/ml]	<7,0

#### 4.2.2. Metoda cytofluorymetrii przepływowej

Badania cytometrii przepływowej przeprowadzono w Laboratorium Zakładu Immunologii Klinicznej w Poznaniu.

Wykorzystano cytofluorymetr przepływowy FACSCanto o 6 kolorach fluorescencji firmy Becton Dickinson (BD). Zestawy znakowanych przeciwciał a także ich pochodzenie zamieszczono w tabeli 7. Koszty powyższych odczynników i koszty przeprowadzenia badań zostały pokryte z grantu nr NN401535740 z Narodowego Centrum Nauki (dla prof. I. Mozer-Lisewskiej).

Dzięki kombinacji przeciwciał anty - CD56, CD16, CD3 możliwe było wyodrębnienie populacji komórek NK spośród komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. 10 próbek (1 kontrolna) każda po 100  $\mu\text{l}$  krwi pełnej inkubowano 15 minut w ciemni z 5  $\mu\text{l}$  znakowanych przeciwciał odpowiednio w każdej z próbek: CD56, CD16, CD3 oraz 8 z nich z jednym z wymienionych: CD107a, CD 158b, CD158i, CD314, CD335, CD336, CD337. Przeciwciała monoklonalne były

znakowane fluoresceiną (FITC) i fikoerytryną (PE). Następnie preparat poddano płukaniu buforowaną solą fizjologiczną pH 7,6 (PBS), a krwinki czerwone poddano lizie z wykorzystaniem płynu lizującego (BD). Preparat ponownie płukano. Probówki zawierające przeciwciała anti-CD253 oraz anti-granzym B wymagały dodatkowej 10-minutowej inkubacji z 0,1% roztworem saponiny po pierwszym płukaniu PBS przed znakowaniem odpowiednimi przeciwciałami i po drugim płukaniu PBS. Kolejne preparaty zostały następnie poddane akwizycji komórek w cytometrze przepływowym. Do akwizycji oraz analizy subpopulacji komórek stosowano program FACS Diva 6.2.1. Wyniki badań podawano jako procent komórek wykazujących obecność badanego antygenu różnicowania oraz jako wartość średniej intensywności fluorescencji badanego antygenu (MFI), odpowiadającej gęstości molekuł antygenu na powierzchni badanej komórki.

**Tabela 7. Znakowane przeciwciała wykorzystane w pracy.**

<b>Klasyfikacja CD</b>	<b>Antygen/receptor</b>	<b>firma</b>
CD 107a	LAMP-1	Miltenyi Biotec
CD 314	NKG2D	j.w.
CD 335	NKp46	j.w.
CD 336	NKp44	j.w.
CD 337	NKp30	j.w.
CD 158b	KIR2DL2/DL3	j.w.
CD 158i	KIR2DS4	j.w.
CD 16	FcγRIII	j.w.
CD 56	NCAM	j.w.
CD 3	Marker limfocytów T	Beckton Dickinson
CD 253	TRAIL	j.w.
Granzym B	Granzym B	j.w.

### 4.3. Analiza statystyczna

Dla wartości parametrów wyrażonych w skali interwałowej policzono średnią, odchylenie standardowe oraz wartość minimalną i maksymalną. Następnie za pomocą testu Shapiro – Wilka sprawdzono zgodność z rozkładem normalnym. Natomiast procentowo przedstawiono rozkład genotypów, rząd wielkości wirerii oraz zapalenie i włóknienie.

W celu porównania wyników wybranych parametrów (cytometrii oraz parametrów klinicznych) grupy badanej z wynikami grupy kontrolnej użyto nieparametrycznego testu Manna – Whitney’ a dla zmiennych niepowiązanych ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym. Test ten użyto również do porównań ze względu na występowanie chorób współistniejących, na aktywność aminotransferaz, wiramię. Porównanie wyników cytometrii w zależności od ekspozycji wykonano za pomocą testu Kruskala – Wallisa.

W pracy przedstawiono wyniki korelacji rang Spearmana dla wyników cytometrii z wiekiem, wynikami badań biochemicznych oraz wynikami określającymi stan wątroby; wyników ekspresji antygenów między sobą. Korelacje są istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ . Korelacja może przyjmować zarówno wartości dodatnie (do +1) jak i wartości ujemne (do -1). Do opisu i interpretacji istotnej korelacji danych przyjmuje się skalę określającą siłę ich związku (tabela 8) .

**Tabela 8. Skala określająca siłę związku korelowanych danych o istotności statystycznej.**

Współczynnik korelacji	Siła związku interpretowanych danych
$R=0$	zmienne nie są skorelowane
$0 < R < 0,1$	korelacja nikła
$0,1 \leq R < 0,3$	korelacja słaba
$0,3 \leq R < 0,5$	korelacja przeciętna
$0,5 \leq R < 0,7$	korelacja wysoka
$0,7 \leq R < 0,9$	korelacja bardzo wysoka
$0,9 \leq R < 1$	korelacja prawie pewna

Obliczenia wykonano w programie Statistica PL firmy StatSoft. Wyniki uznano za istotne statystycznie przy  $p < 0,05$ .

## 5. Wyniki

### 5.1. Charakterystyka grupy badanej

#### 5.1.1. Wiek i płeć badanych

W grupie badanych (n=98) mężczyźni stanowili 57% (56 chorych), kobiety – 43% (42 chore). Wiek chorych w momencie pobierania materiału biologicznego na badania kształtował się od 20 do 67 lat (średnio  $41,88 \pm 6,95$ ).

Na podstawie daty wykazania dodatnich przeciwciał anti-HCV (określana jako „wiek w momencie rozpoznania zakażenia” obliczono czas od zakażenia – w badaniach przedstawiany jako „znany czas zakażenia”. W badanej grupie wahał się on od 1 roku do 29 lat (średnio  $4,79 \pm 2,78$ ).

Oczywiście może być to obarczone błędem z uwagi na fakt, że u większości chorych zakażenie wykrywa się przypadkowo. Chodziło jednak o próbę wyliczenia czasu, kiedy wirus mnożył się, atakował narządy, implikował różnorodne zmiany immunologiczne w organizmie zakażonego.

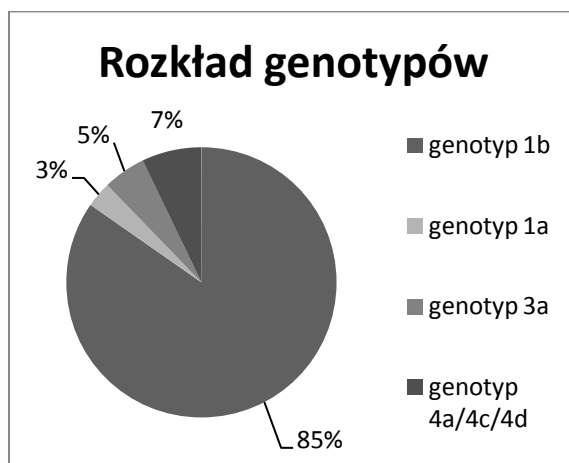
Powyżej rozważane parametry zamieszczono w tabeli 9.

**Tabela 9. Wiek chorych i znany okres zakażenia HCV z podziałem na płeć.**

		N	% grupy	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
OGÓLEM	wiek w momencie rozpoznania zakażenia	98	100	37,09	11,00	65,00	14,47
	wiek chorego	98	100	41,88	20,00	67,00	13,90
	znany czas zakażenia	98	100	4,79	1,00	29,00	5,56
KOBIECY	wiek w momencie rozpoznania zakażenia i badań	42	43	35,98	11,00	65,00	15,73
	wiek chorego	42	43	40,67	20,00	67,00	14,82
	znany czas zakażenia	42	43	4,69	1,00	28,00	6,43
MĘŻCZYŹNI	wiek w momencie rozpoznania zakażenia i badań	56	57	37,93	18,00	63,00	13,53
	wiek chorego	56	57	42,79	22,00	67,00	13,22
	znany czas zakażenia	56	57	4,86	1,00	29,00	4,87

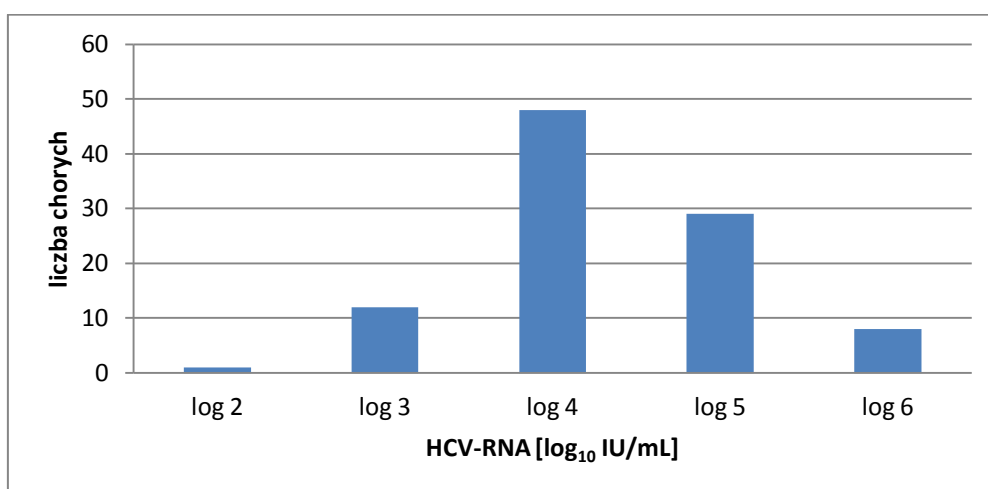
### 5.1.2. Dane dotyczące genotypu wirusa i wirerii

Rozkład poszczególnych genotypów wśród zakażonych HCV przedstawiono na Ryc. 10. U 85% chorych rozpoznano genotyp 1b wirusa. Następnie kolejno: genotyp 4a/4c/4d u 7%, genotyp 3a u 5% i genotyp 1a u 3% .



Rycina 10. Rozkład częstości genotypów w grupie badanej (n=98).

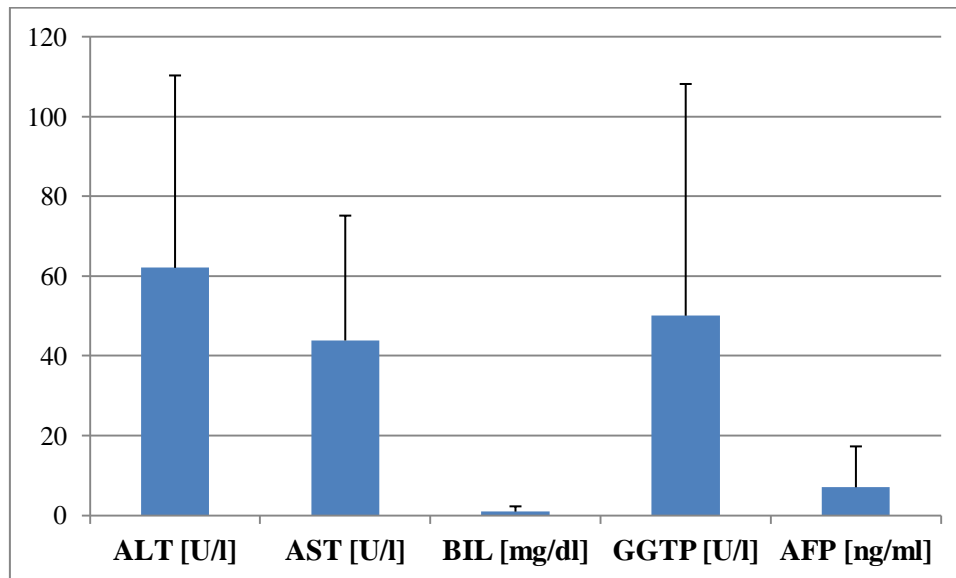
U 48 chorych (49% grupy HCV+) w momencie pobierania badań rząd wielkości ładunku wirusowego wynosił  $10^4$  IU/ml, u 29 chorych (30% ) natomiast –  $10^5$  IU/ml. W celu uproszczenia wyników, ładunek wirusowy (wirerii) przedstawiono za pomocą logarytmu dziesiętnej wartości rzeczywistej. Wyniki ilustruje Rycina 11. Rzeczywiste wartości ładunku wirusowego (wirerii) kształtowały się od  $0,68 \times 10^3$  do  $6,59 \times 10^6$  IU/ml (średnia  $3,28 \times 10^5$ , SD  $8,29 \times 10^5$  IU/ml).



Rycina 11. Rozkład ładunku wirusowego HCV-RNA w grupie badanej.

### 5.1.3. Badania laboratoryjne

Rozkład średnich wartości poszczególnych parametrów biochemicznych i AFP zamieszczono na Rycinie 12.



Rycina 12. Rozkład wartości prób wątrobowych i AFP w grupie badanej.

W tabeli 10. natomiast podano, ile osób prezentowało wynik poniżej górnej granicy normy ( $\leq$ GGN) i powyżej GGN ( $>$ GGN).

**Tabela 10. Badania biochemiczne i AFP w grupie zakażonych (n=98). Podano ile osób prezentowało wynik powyżej górnej granicy normy (GGN) i powyżej wielokrotności GGN (nxGGN).**

Liczba osób $\leq$ i $>$ GGN	ALT	AST	BIL	GGTP	AFP
$\leq$ GGN	37	54	74	85	77
$>$ GGN	61	44	24	13	21

Z badania morfologicznego krwi obwodowej przeanalizowano liczbę leukocytów i limfocytów. Średnie ich wartości mieściły się w zakresach norm (tabela 11).

Liczbę komórek NK w objętości  $1 \text{ mm}^3$  obliczono na podstawie wartości WBC. Z wartość tej wyliczono liczbę limfocytów w objętości  $1 \text{ mm}^3$ , a następnie liczbę komórek NK w obrębie limfocytów.

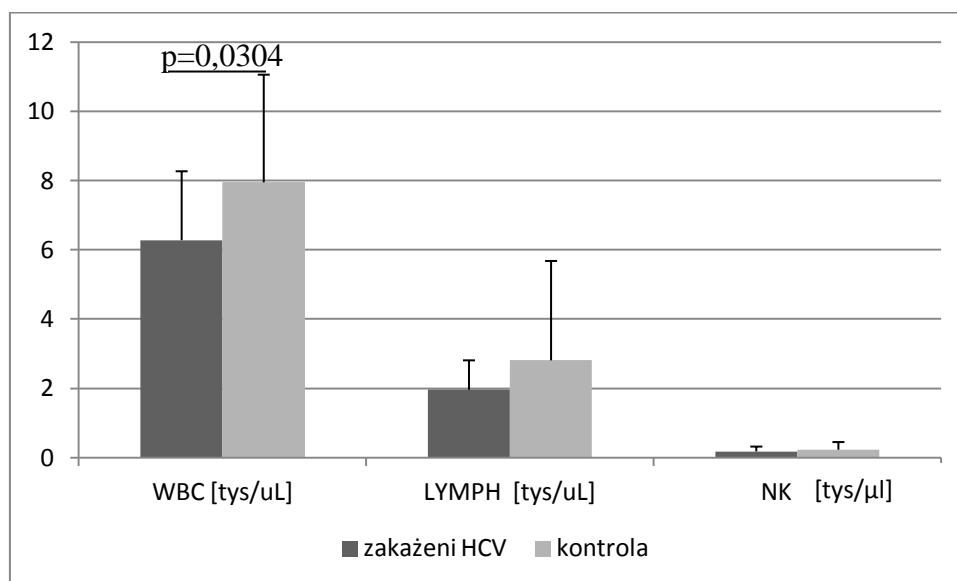
**Tabela 11. Rozkład wartości dotyczących leukocytów, limfocytów oraz komórek NK w grupie badanej**

	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
WBC tys/ $\mu$ L	98	6,28	2,40	11,80	1,99	<b>0,0304</b>
LYMPH tys/ $\mu$ L	98	1,96	0,00	4,10	0,85	0,5583
NK tys/ $\mu$ L	98	0,18	0,00	0,73	0,14	0,3059

W grupie badanej wykazano istotnie statystycznie niższą wartość WBC w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p=0,0304$ ).

Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla liczby limfocytów ( $p=0,5583$ ) i komórek NK ( $p=0,3059$ ).

Na Rycinie 13 przedstawiono rozkład wartości WBC, limfocytów i NK w poszczególnych grupach.



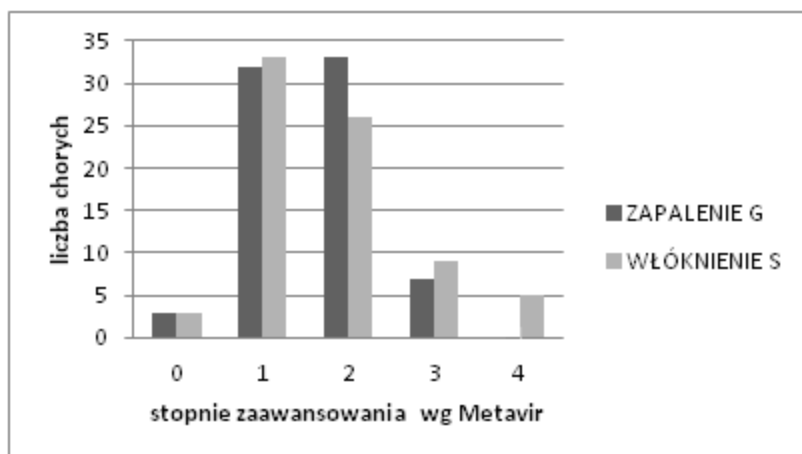
**Rycina 13. Rozkład wartości leukocytów (WBC), limfocytów (LYMPH) i komórek NK w grupie badanej i kontrolnej**

#### 5.1.4. Badanie patomorfologiczne

Biopsja wątroby przeprowadzona została u 76 pacjentów przed rozpoczęciem leczenia przeciwwirusowego. U 22 chorych nie przeprowadzono badania biopsyjnego z uwagi na przeciwwskazania techniczne (zmiany o charakterze naczyńniaka w prawym płacie wątroby u 2 osób, poszerzenie dróg żółciowych wewnątrzwątrobowych u 3 osób, trudny dostęp – u 3 osób), przeciwwskazania hematologiczne (trombocytopenia (liczba płytek krwi PLT < 60 x 10<sup>6</sup>/l), przedłużenie czasu protrombinowego PT > 3 s po próbie korekcji czasu witaminą K u 7 osób), 7 osób nie wyraziło zgody na badanie inwazyjne.

Stłuszczenie wątroby w grupie badanej dotyczyło od 0 – 95% utkania wątroby (średnia – 7,01± 8,91).

Stadium zapalenia i włóknienia wątroby w grupie badanej przedstawiono na Rycinie 14. Zapalenie wątroby w stadium 1 i 2 wykazano u 67% chorych. U 61% chorych włóknienie wątroby sklasyfikowano w stadium 1 i 2.



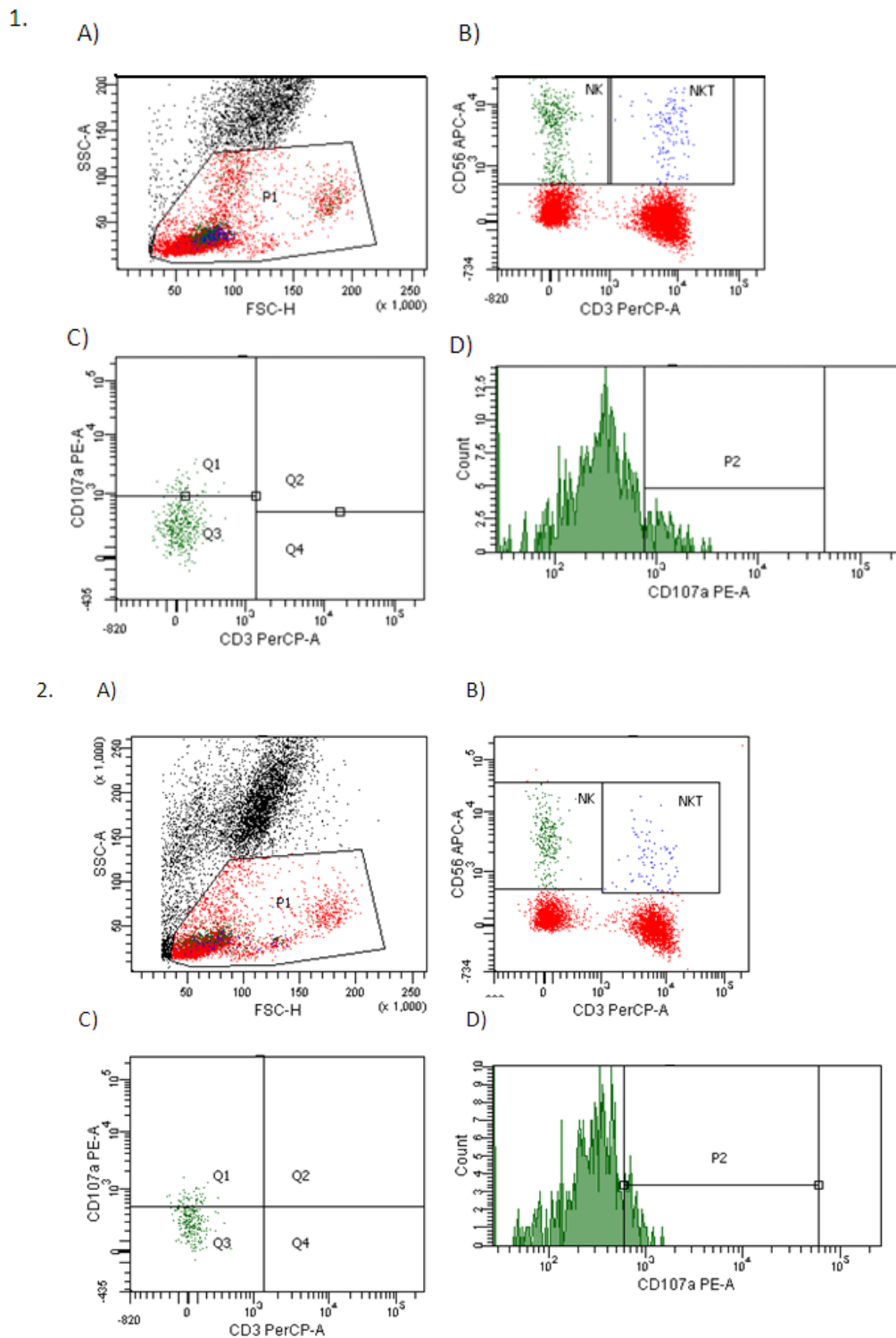
Rycina 14. Rozkład wyników zapalenia i włóknienia wątroby względem liczby chorych.

#### 5.2. Analiza immunofenotypu komórek NK krwi obwodowej u pacjentów z grupy badanej

Na Rycinie 15 przedstawiono przykładowy obraz cytometryczny limfocytów i monocytów krwi obwodowej u osoby należącej do grupy zakażonych HCV (chory o inicjałach K.H., lat 54 - przykład nr 1 i C.S. lat 36 – przykład nr 2) oraz ekspresję jednego z badanych receptorów na komórkach NK wraz ze średnią intensywnością sygnału fluorescencyjnego.

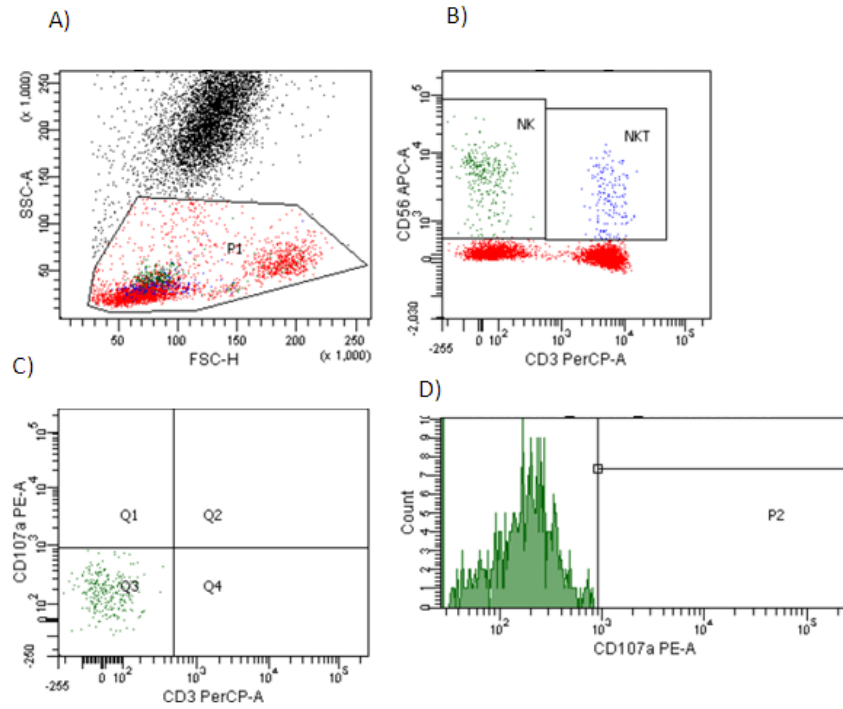
Na Rycinie 16 przedstawiono rozkład cytometryczny osoby należącej do grupy kontrolnej (o inicjałach P.B., próbka nr 031- przykład nr 1 i W.W próbka nr 093- przykład nr 2).



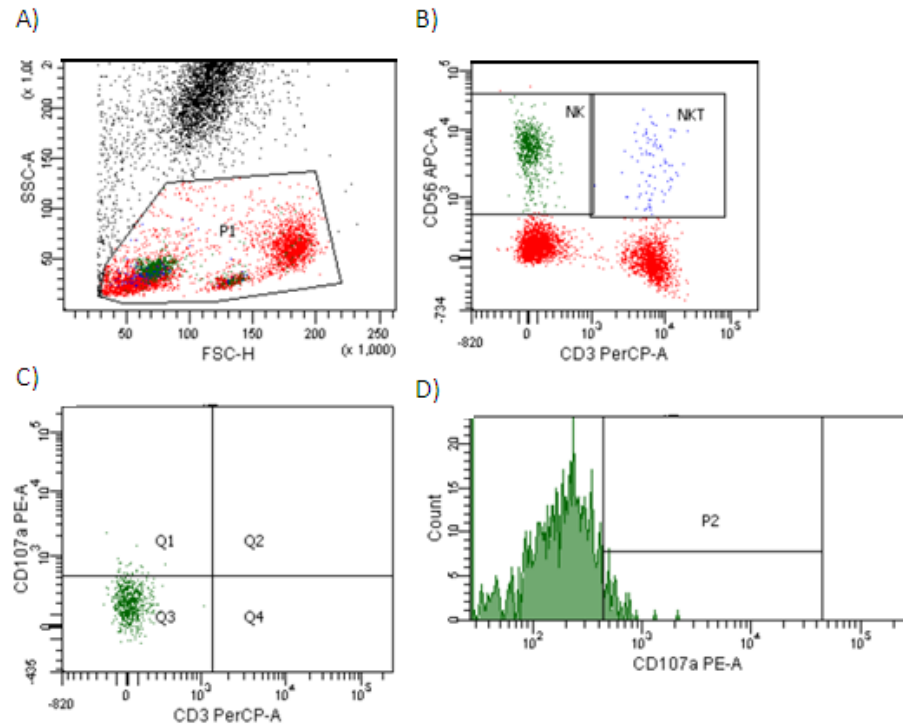


**Rycina 15. Przykładowy rozkład cytometryczny limfocytów i monocytów krwi obwodowej u osoby należącej do grupy zakażonych HCV+. 1. Chory o inicjałach K.H., lat 54 A) wybramkowana subpopulacja komórek jednojądrzastych; B) Komórki NK i NKT, C) Komórki CD107a+ (Q1), D) MFI kom. CD107a+ (P2). 2. Chory C.S, lat 36 – opis jak u chorego K.H.**

1.



2.



Rycina 16. Przykładowy rozkład cytometryczny limfocytów i monocytów krwi obwodowej u osoby należącej do grupy kontrolnej. 1. Kontrola P.B., A) wybrankowana subpopulacja komórek jednojądrzastych; B) Komórki NK i NKT, C) Komórki CD107a+ (Q1), D) MFI kom. CD107a+ (P2). 2. Kontrola W.W. – opis jak u kontroli P.B.

### 5.2.1. Porównanie wyników cytometrycznych w grupie chorych względem kontroli

Dla każdej osoby z grupy zakażonych HCV jak i grupy kontrolnej oznaczono odsetek komórek NK z dodatnim antygenem i odsetek komórek NK z ujemnym antygenem oraz średnią intensywność fluorescencji, MFI – ang. *Mean Fluorescence Intensity*; MFI dotyczy komórek NK z dodatnim receptorem badanym. W poniższych Tabelach od 11 do 19 przedstawiono rozkład wyżej wymienionych parametrów w grupie badanej dla każdego z badanych receptorów.

W Tabeli 12 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych CD107a z uwzględnieniem podziału grupy badanej na zakażonych HCV i grupę kontrolną.

**Tabela 12. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD107a w grupie badanej**

<b>CD107a w grupie chorych i zdrowych</b>							
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	P
NK CD107a+ [%]	chorzy	98	3,61	0,00	27,94	4,85	<b>p=0,0483</b>
	zdrowi	13	2,23	0,00	15,52	4,44	
NK CD107a- [%]	chorzy	98	95,97	72,06	100,00	5,37	<b>p=0,0326</b>
	zdrowi	13	97,72	84,48	100,00	4,50	
MFI CD107a	chorzy	98	854,44	0,00	5029,00	719,83	0,1187
	zdrowi	13	756,77	0,00	4229,00	1109,98	

Istnieje statystycznie istotna różnica między chorymi a zdrowymi dla NK CD107a+ [%] ( $p=0,0483$ ). Istnieje statystycznie istotna różnica między chorymi a zdrowymi dla NK CD107a- [%] ( $p=0,0326$ ). Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla MFI CD107a ( $p=0,1187$ ).

W Tabeli 13 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych CD158b z uwzględnieniem podziału grupy badanej na zakażonych HCV i grupę kontrolną.

**Tabela 13. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD158b w grupie badanej**

<b>CD158b w grupie chorych i zdrowych</b>							
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	P
NK CD158b+ [%]	chorzy	98	25,74	0,00	65,79	12,86	0,8811
	zdrowi	13	26,86	5,40	51,94	13,59	
NK CD158b- [%]	chorzy	98	71,99	0,00	100,00	16,12	0,9098
	zdrowi	13	72,99	46,12	94,60	13,89	
MFI CD158b+	chorzy	98	2762,10	0,00	10879,00	1755,05	0,6663
	zdrowi	13	2373,77	1345,00	4804,00	940,38	

Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla NK CD158b+ [%] (p=0,8811), NK CD158b- [%] (p=0,9098) i MFI CD158b+ (p=0,6663).

W Tabeli 14 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych CD158i z uwzględnieniem podziału grupy badanej na zakażonych HCV i grupę kontrolną.

**Tabela 14. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD158i w grupie badanej**

<b>CD158i w grupie chorych i zdrowych</b>							
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	P
NK CD158i+ [%]	chorzy	98	13,88	0,00	73,82	20,31	0,5401
	zdrowi	13	12,99	0,00	68,46	21,66	
NK CD158i- [%]	chorzy	98	84,79	0,00	100,00	22,06	0,4428
	zdrowi	13	86,95	31,21	100,00	21,78	
MFI CD158i+	chorzy	98	3655,54	0,00	27854,00	5218,00	0,2416
	zdrowi	13	2663,08	0,00	13617,00	4131,78	

Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla NK CD158i+ [%] (p=0,5401), NK CD158i- [%] (p=0,4428) i MFI CD158i+ (p=0,2416) dla receptora CD 158i.

W Tabeli 15 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych CD314 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na zakażonych HCV i grupę kontrolną.

**Tabela 15. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD314 w grupie badanej**

CD314 w grupie chorych i zdrowych							
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	P
NK CD314+ [%]	chorzy	98	86,47	0,00	98,57	19,62	0,2380
	zdrowi	13	85,88	0,76	98,66	26,33	
NK CD314- [%]	chorzy	98	11,61	0,00	100,00	15,47	0,3608
	zdrowi	13	14,09	1,34	99,24	26,33	
MFI CD314+	chorzy	98	3461,46	0,00	7447,00	1569,04	0,3560
	zdrowi	13	3175,77	761,00	7103,00	1767,73	

Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla NK CD314+ [%] ( $p=0,2380$ ), NK CD314- [%] ( $p=0,3608$ ) i MFI CD314+ ( $p=0,3560$ ).

W Tabeli 16 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych CD335 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na zakażonych HCV i grupę kontrolną.

**Tabela 16. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD335 w grupie badanej**

CD335 w grupie chorych i zdrowych							
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	P
NK CD335+ [%]	chorzy	98	75,89	0,00	96,79	20,67	0,0926
	zdrowi	13	83,43	46,82	96,20	14,70	
NK CD335- [%]	chorzy	98	22,53	0,00	100,00	18,81	0,1301
	zdrowi	13	16,55	3,80	53,18	14,71	
MFI CD335+	chorzy	98	3562,00	0,00	10934,00	1852,69	0,5831
	zdrowi	13	3977,15	2100,00	9262,00	2100,38	

Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla NK CD335+ [%] ( $p=0,0926$ ), NK CD335- [%] ( $p=0,1301$ ) i MFI CD335+ ( $p=0,5831$ ).

W Tabeli 17 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych CD336 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na zakażonych HCV i grupę kontrolną.

**Tabela 17. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD336 w grupie badanej**

CD336 w grupie chorych i zdrowych							
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	P
NK CD336+ [%]	chorzy	98	2,82	0,00	99,81	13,71	0,2099
	zdrowi	13	0,40	0,00	2,04	0,66	
NK CD336- [%]	chorzy	98	96,09	0,00	100,00	16,91	0,1081
	zdrowi	13	99,60	97,96	100,00	0,66	
MFI CD336+	chorzy	98	887,19	0,00	21046,00	2228,92	0,2889
	zdrowi	13	392,23	0,00	980,00	430,65	

Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla NK CD336+ [%] (p=0,2099), NK CD336- [%] (p=0,1081) i MFI CD336+ (p=0,2889).

W Tabeli 18 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych CD337 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na zakażonych HCV i grupę kontrolną.

**Tabela 18. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD337 w grupie badanej**

CD337w grupie chorych i zdrowych							
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	P
NK CD337+ [%]	chorzy	98	71,92	0,00	99,15	20,39	0,2847
	zdrowi	13	78,49	42,84	92,39	13,45	
NK CD337- [%]	chorzy	98	27,49	0,85	100,00	20,04	0,3191
	zdrowi	13	21,45	7,14	57,16	13,53	
MFI CD337+	chorzy	98	2511,69	0,00	7264,00	1295,25	0,7475
	zdrowi	13	2531,85	951,00	5440,00	1473,38	

Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla NK CD337+ [%] (p=0,2847), NK CD337- [%] (p=0,3191) i MFI CD337+ (p=0,7475) dla receptora CD 337.

U części pacjentów zarówno z grupy zakażonych HCV jak i grupy kontrolnej zbadano również antygeny CD 253 i granzym B. Mniejsza liczba osób objęta tymi badaniami była spowodowana ograniczoną dostępnością odczynników oraz odmienną techniką przygotowywania preparatu do akwizycji komórek w cytofluorymetrze przepływowym.

W Tabeli 19 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych CD253 z uwzględnieniem podziału grupy badanej na zakażonych HCV i grupę kontrolną.

**Tabela 19. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD253 w grupie badanej**

<b>CD253 w grupie chorych i zdrowych</b>							
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
NK CD253+ [%]	chorzy	46	9,03	0,00	100,00	15,31	<b>0,0089</b>
	zdrowi	7	2,11	0,00	7,54	2,56	
NK CD253- [%]	chorzy	46	90,65	0,00	100,00	15,35	<b>0,0116</b>
	zdrowi	7	97,53	90,95	100,00	2,99	
MFI CD253+	chorzy	46	1748,85	0,00	12355,00	2362,26	0,7812
	zdrowi	7	2980,14	393,00	14289,00	5068,13	

Istnieje statystycznie istotna różnica między chorymi a zdrowymi dla NK CD253+ [%] ( $p=0,0089$ ). Istnieje statystycznie istotna różnica między chorymi a zdrowymi dla NK CD253- [%] ( $p=0,0116$ ). Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla MFI CD253+ ( $p=0,7812$ ).

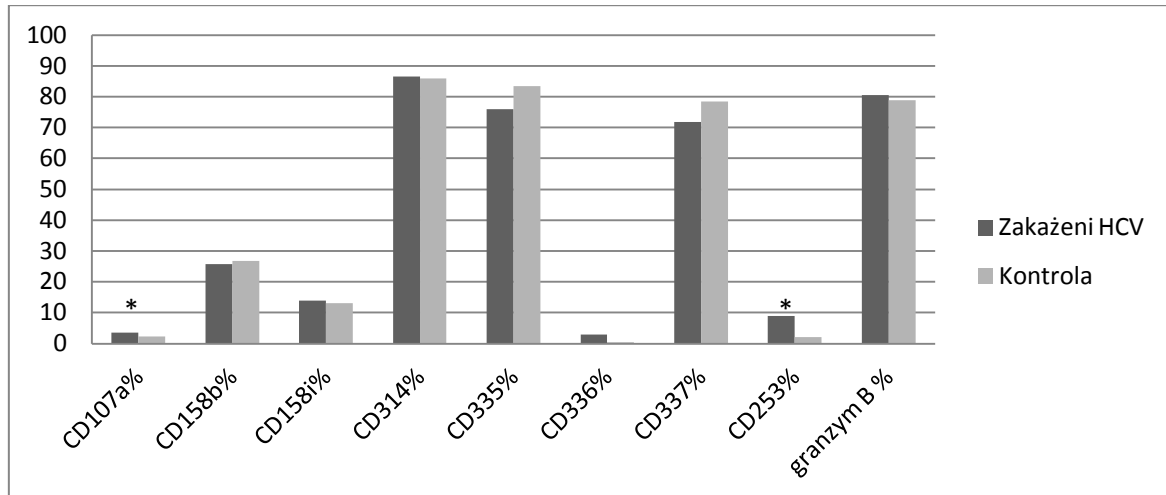
W Tabeli 20 przedstawiono rozkład średnich wartości odsetkowych granzym B z uwzględnieniem podziału grupy badanej na zakażonych HCV i grupę kontrolną.

**Tabela 20. Rozkład średnich wartości odsetkowych granzym B w grupie badanej**

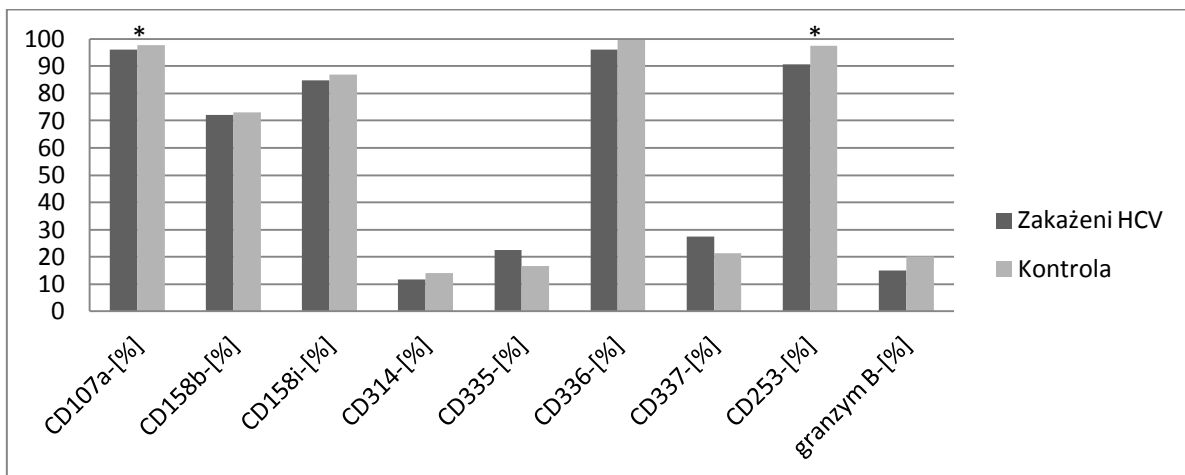
<b>granzym B w grupie chorych i zdrowych</b>							
		N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
NK granzym B+ [%]	chorzy	46	80,56	1,49	100,00	25,05	0,8876
	zdrowi	7	78,95	0,25	97,25	34,88	
NK granzym B- [%]	chorzy	46	14,91	0,00	95,83	25,02	0,2942
	zdrowi	7	20,08	2,75	94,35	32,92	
MFI granzym B+	chorzy	46	7325,63	784,00	19661,00	4392,64	<b>0,0116</b>
	zdrowi	7	3378,14	498,00	9032,00	2776,15	

Istnieje statystycznie istotna różnica między chorymi a zdrowymi dla MFI granzym B+ ( $p=0,0116$ ). Nie wykazano istotności statystycznej między grupą zakażoną HCV a grupą kontrolną dla NK granzym B+ [%] ( $p=0,8876$ ), NK granzym B- [%] ( $p=0,2942$ ).

Na Rycinach 17-19 przedstawiono graficznie średnie wyników z zaznaczeniem istotności statystycznej na poziomie  $p < 0,05$ . Na pierwszej z nich zestawiono badania u chorych względem kontroli dotyczące odsetka komórek NK z dodatnim badanym receptorem. Na Rycinie 18 - odsetka komórek NK z ujemnym badanym receptorem. Na Rycinie 19 – MFI badanego receptora komórek NK.

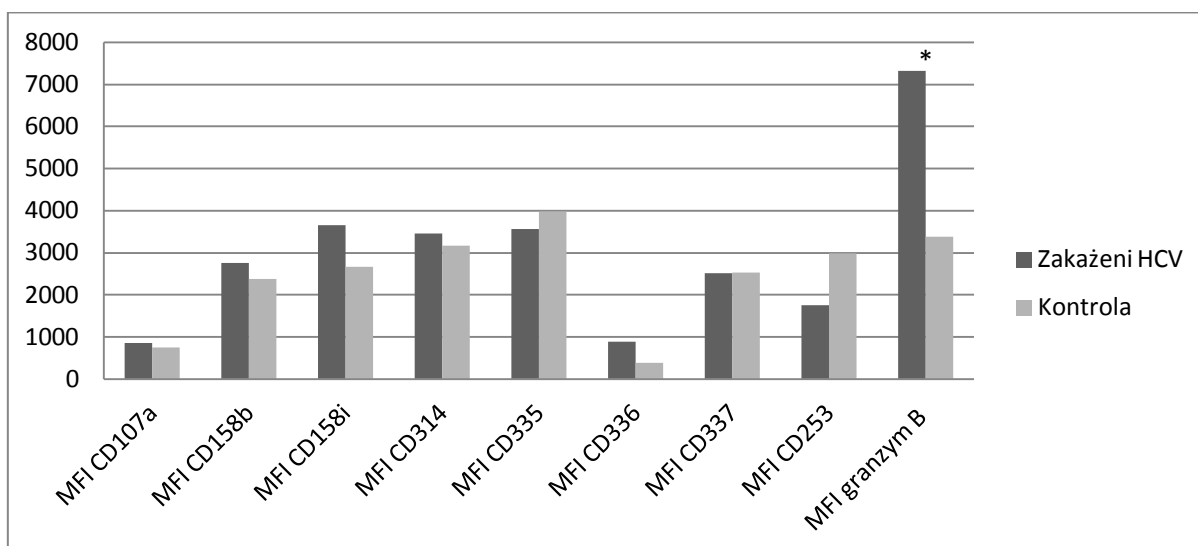


**Rycina 17. Porównanie średnich wartości odsetka komórek NK z obecnym antygenem w grupie zakażonych HCV vs. kontrola. \* -  $p < 0,05$**



**Rycina 18. Porównanie średnich wartości odsetka komórek NK z nieobecnym antygenem w grupie zakażonych HCV vs. kontrola. \* -  $p < 0,05$**





**Rycina 19. Porównanie średnich wartości MFI poszczególnych antygenów w grupie zakażonych HCV vs. kontrola. \* -  $p < 0,05$**

## 5.2.2. Porównanie cytometrii względem danych klinicznych w grupie chorych

W grupie zakażonych HCV porównano CD 107a, CD 158b, CD 158i, CD 314, CD 335, CD 336, CD 337, CD 253, granzym B z danymi klinicznymi (wiek, wiremia, biochemia, AFP, stan wątroby, obecność chorób współistniejących).

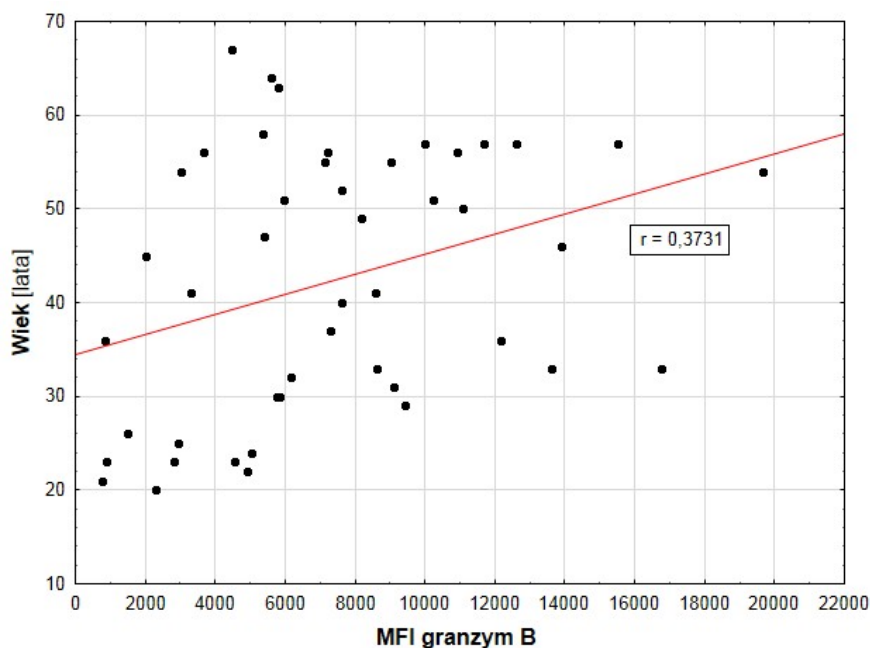
### 5.2.2.1. Korelacje wieku pacjentów z wynikami cytometrii

Porównanie zależności wieku chorych do wyników cytometrycznych przedstawiono za pomocą korelacji. W Tabeli 21 przedstawiono obliczenia dotyczące korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów a obecnością (np. NK CD107a+ [%]), brakiem obecności (np. NK CD107a- [%]) oraz MFI badanych antygenów komórek NK.

**Tabela 21. Korelacje wieku pacjentów z wynikami cytometrii.**

<b>GRUPA BADANA n=98 (CD 253, granzym B, n=46)</b>		
<b>Badany antygen/receptor</b>	<b>współczynnik korelacji r</b>	<b>p</b>
NK CD107a+ [%]	0,1880	0,0638
NK CD107a- [%]	-0,1548	0,1280
MFI CD107a+	0,1237	0,2248
NK CD158b+ [%]	0,1401	0,1688
NK CD158b- [%]	-0,1553	0,1267
MFI CD158b+	-0,0332	0,7453
NK CD158i+ [%]	0,0414	0,6855
NK CD158i- [%]	0,0101	0,9213
MFI CD158i+	-0,0920	0,3675
NK CD314+ [%]	-0,0781	0,4449
NK CD314- [%]	0,0667	0,5142
MFI CD314+	-0,2547	0,0114
NK CD335+ [%]	-0,0907	0,3744
NK CD335- [%]	0,0821	0,4218
MFI CD335+	-0,1998	0,0485
NK CD336+ [%]	0,2139	0,0344
NK CD336- [%]	-0,2374	0,0186
MFI CD336+	0,0135	0,8951
NK CD337+ [%]	-0,1979	0,0508
NK CD337- [%]	0,2082	0,0396
MFI CD337+	-0,1768	0,0816
NK CD253+ [%]	-0,1033	0,4945
NK CD253- [%]	0,0548	0,7176
MFI CD253+	0,0792	0,6008
NK granzym B+ [%]	0,1704	0,2577
NK granzym B- [%]	-0,2765	0,0629
MFI granzym B+	<b>0,3731</b>	<b>0,0106</b>

Istnieje przeciętna dodatnia korelacja między wiekiem pacjentów a MFI granzymu B o współczynniku korelacji  $r=0,3731$ . Mimo, że część wyników również jest istotna statystycznie, są to bardzo słabe korelacje (żaden współczynnik korelacji nie przekracza progu 0,3). Na Rycinie 20 przedstawiono graficznie korelację MFI granzym B względem wieku chorych.



**Rycina 20. Korelacja MFI granzym B względem wieku chorych.**

#### **5.2.2.2. Korelacje wyników biochemicznych i AFP z wynikami cytometrii**

W Tabeli 22 zamieszczono obliczenia dotyczące korelacji wyników cytometrycznych z danymi biochemicznymi oraz AFP w grupie HCV+.

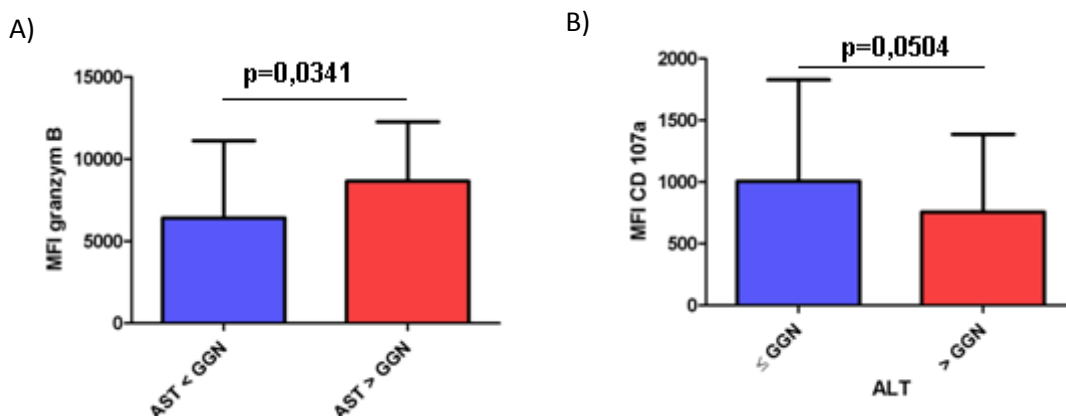
**Tabela 22. Korelacje wyników biochemii i AFP z wynikami cytometrii. W Tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji r dla badanych parametrów.**

Badany antygen/receptor	Współczynnik korelacji r				
	ALT	AST	BIL	GGTP	AFP
NK CD107a+ [%]	0,0674	0,1212	0,0287	0,0991	0,1004
NK CD107a- [%]	-0,0699	-0,1103	-0,0698	-0,0750	-0,0873
MFI CD107a+	0,0279	0,1180	0,0588	0,2050	0,1923
NK CD158b+ [%]	0,1454	0,1206	0,0454	0,0436	-0,0556
NK CD158b- [%]	-0,1655	-0,1114	-0,0937	0,0202	0,1082
MFI CD158b+	0,0619	-0,0215	0,1057	0,1569	-0,0200
NK CD158i+ [%]	-0,0176	0,0037	0,1338	-0,0853	-0,0694
NK CD158i- [%]	-0,0028	-0,0042	-0,1603	0,0792	0,0829
MFI CD158i+	-0,0928	-0,0752	0,1821	0,0215	-0,0904
NK CD314+ [%]	-0,0188	0,0529	-0,1727	-0,0524	-0,0578
NK CD314- [%]	0,0186	-0,0079	0,1551	0,1245	0,1082
MFI CD314+	-0,0803	-0,1374	-0,0063	0,0915	-0,1119
NK CD335+ [%]	-0,0932	-0,1267	-0,1583	-0,0353	-0,0072
NK CD335- [%]	0,1072	0,1840	0,1710	0,0976	0,0607
MFI CD335+	0,0237	-0,0537	0,0367	0,0690	-0,0678
NK CD336+ [%]	-0,1103	-0,0047	-0,0375	0,0500	-0,0580
NK CD336- [%]	0,1072	0,0369	0,0195	-0,0148	0,1033
MFI CD336+	-0,1765	-0,1390	-0,0227	-0,0592	-0,1280
NK CD337+ [%]	0,1003	-0,0225	-0,0792	0,0757	-0,0421
NK CD337- [%]	-0,0780	0,0376	0,0937	-0,0500	0,0397
MFI CD337+	0,0737	-0,0227	-0,0142	0,1185	-0,0363
NK CD253+ [%]	-0,1031	<b>-0,3014</b>	-0,0483	-0,0596	-0,2242
NK CD253- [%]	0,0924	0,2868	0,0282	0,0240	0,1877
MFI CD253+	0,0399	0,0510	-0,1255	0,1729	0,1277
NK granzym B+ [%]	0,1146	-0,0460	-0,2258	0,1209	-0,0516
NK granzym B- [%]	-0,2469	0,0231	0,2020	-0,1232	0,0225
MFI granzym B+	0,2180	0,2158	-0,1658	0,2573	0,0651

Istnieje przeciętna ujemna korelacja między AST a odsetkiem komórek NK CD253+ o współczynniku korelacji  $r=-0,3014$ .

### 5.2.2.3. Porównanie wyników cytometrii w grupach w zależności od aktywności aminotransferaz

Grupę HCV+ podzielono na grupę, gdzie aktywność aminotransferazy była w zakresie norm referencyjnych ( $\leq$ GGN) oraz grupę -  $>$ GGN. Porównano te grupy pod kątem wyników cytometrycznych (danych nie pokazano). Poniżej przedstawiono wyłącznie dane o istotnych różnicach. Pozostałych danych nie pokazano. Na Rycinie 21 zamieszczono wykres MFI granzyemu B w grupach  $\leq$  (n=54) i  $>$  (n=44) GGN AST, dla których wykazano różnicę na poziomie istotności ( $p=0,0341$ ) oraz CD107a w grupach  $\leq$  (n=37) i  $>$  (n= 61) GGN ALT, dla których wykazano różnicę na granicy istotności statystycznej ( $p=0,0504$ ) u osób zakażonych HCV.



Rycina 21. Wykres MFI granzyemu B w grupach  $\leq$  i  $>$  GGN AST (A) oraz MFI CD 107a w grupach  $\leq$  i  $>$  GGN ALT (B) u osób zakażonych.

### 5.2.2.4. Porównanie zależności pomiędzy ekspresją receptorów komórek NK

Porównano zależności pomiędzy odsetkami komórek NK z kolejnymi dodatnimi receptorami i ich MFI u pacjentów HCV dodatnich (n=98). Wykazano przeciętną dodatnią korelację pomiędzy odsetkami komórek NK z obecnością antygenów CD314 i CD335 ( $r=0,36$ ). Porównując MFI poszczególnych receptorów, znaleziono przeciętną dodatnią korelację pomiędzy MFI CD314 i CD107a ( $r=0,36$ ) oraz CD335 i CD253 ( $r=0,36$ ). Istotne dane zamieszczono zbiorczo

w następnym podrozdziale w Tabeli 22. Pozostałych danych nie pokazano. Wykonano również korelację pomiędzy odsetkami komórek NK z dodatnim antygenem względem odsetka komórek NK z ujemnym antygenem. W 9 przypadkach, gdzie wynik był istotny statystycznie, współczynnik korelacji był jedynie słaby ( $r < 0,3$ ). (Danych nie pokazano.)

#### 5.2.2.5. Porównanie wyników cytometrii w grupie z wysoką wiremią vs. cała grupa HCV+

Porównano zależności odsetków komórek NK z dodatnimi receptorami i ich MFI u pacjentów HCV dodatnich z wiremią rzędu  $> 10^5$  ( $n=37$ ) wyodrębnionych z grupy badanej HCV ( $n=98$ ). Wykazano przeciętną dodatnią korelację pomiędzy odsetkami komórek NK z obecnością antygenów CD314 i CD335 ( $r=0,45$ ), pomiędzy CD314 i CD337 ( $r=0,4$ ) oraz CD107a i CD158i ( $r=0,35$ ).

Porównując MFI poszczególnych receptorów, znaleziono wysoką dodatnią korelację pomiędzy MFI CD314 i CD335 ( $r=0,66$ ), CD314 i CD107a ( $r=0,6$ ), CD314 i CD158b ( $r=0,58$ ), CD158b i CD337 ( $r=0,63$ ), CD158b i CD335 ( $r=0,55$ ).

W Tabeli 23 zestawiono wyniki powyższych korelacji, tj w grupie HCV z wiremią  $>10^5$  oraz w całej grupie badanej HCV. Zamieszczono dane, gdzie  $p < 0,5$ . Pozostałych danych nie pokazano.

**Tabela 23. Zestawienie wyników korelacji w grupie HCV z wiremią  $>10^5$  oraz wyników korelacji w całej grupie HCV dodatniej.**

Porównywanie pary receptorów komórek NK	Korelacja w grupie z wiremią rzędu $> 10^5$ ( $n=37$ )	Korelacja w grupie HCV ( $n=98$ )
%CD314 i %CD335	$r=0,45$	$r=0,36$
%CD107a i %CD158i	$r=0,35$	$r=0,3$
%CD314 i %CD337	$r=0,4$	Brak korelacji
MFI CD314 i MFI CD335	$r=0,66$	Brak korelacji
MFI CD314 i MFI CD107a	$r=0,6$	$r=0,36$
MFI CD335 i MFI CD253	Brak korelacji	$r=0,36$

### 5.2.2.6. Porównanie wyników cytometrii w grupie z niską i wysoką wiremią

Porównano wyniki pacjentów HCV dodatnich z wiremią rzędu  $> 10^5$  IU/ml (n=37) z chorymi z wiremią rzędu  $\leq 10^5$  IU/ml (n=61). W Tabeli 24 przedstawiono wyniki porównania danych cytometrycznych u chorych HCV+ w zależności od wiremii. Przedstawiono wyłącznie wyniki o znaczących różnicach. Pozostałych danych nie pokazano.

**Tabela 24. Porównanie wyników cytometrycznych w grupie HCV+ w zależności od wiremii.**

Badany antygen/receptor	Grupa HCV+		p
	wiremia $>10^5$ IU/ml (n=37)	wiremia $\leq 10^5$ IU/ml (n=61)	
MFI CD335	3067±1607	3862±1938	0,0501
MFI CD158b	2307±1244	3038±1961	0,0812

Różnicę na granicy istotności statystycznej wykazano dla MFI CD335 pomiędzy badanymi grupami. Znaczące różnice pomiędzy średnimi wynikami obu grup zaobserwowano dla MFI CD158b, nie wykazano jednak istotności statystycznej (p=0,08). Pozostałe różnice wyników między grupami nie były istotne statystycznie .

### 5.2.2.7. Korelacje stanu wątroby z wynikami cytometrii

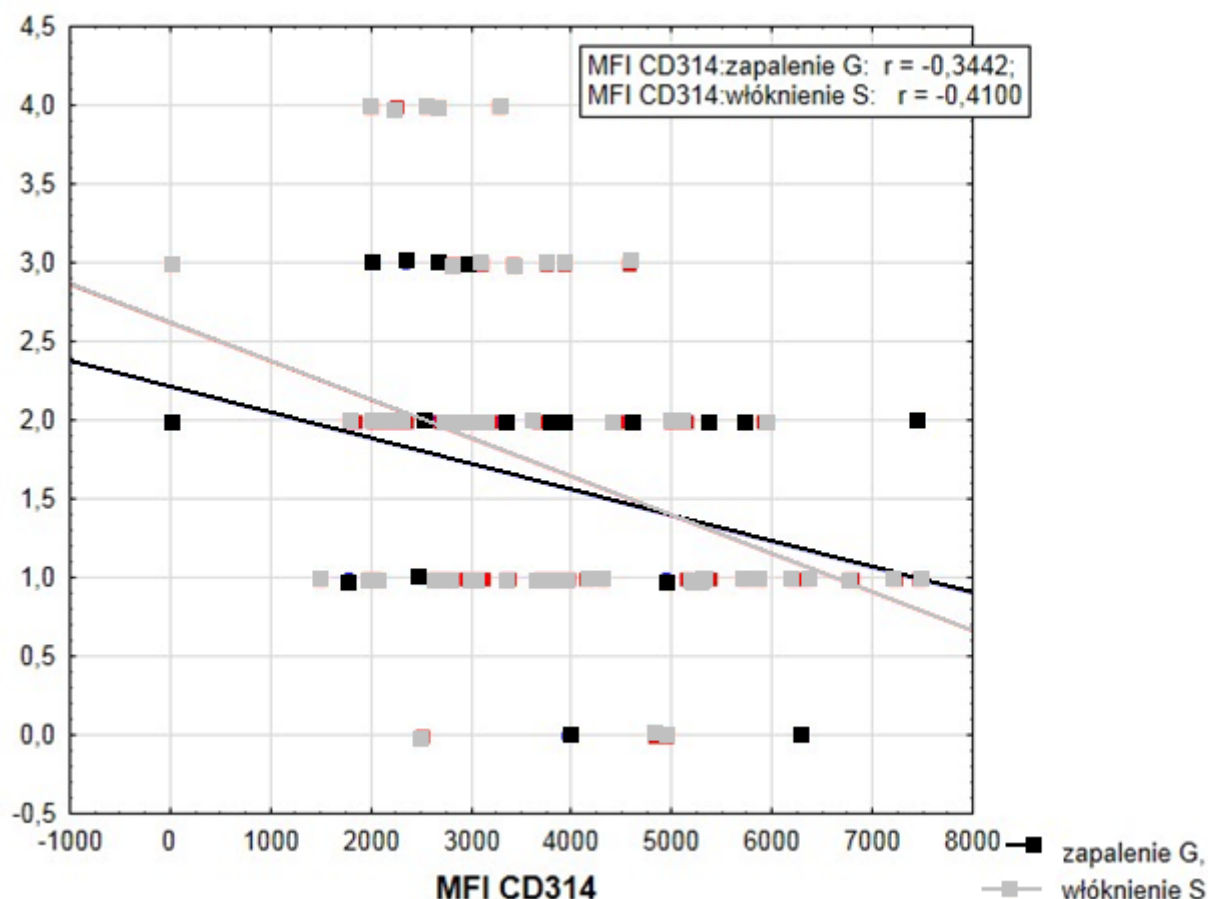
W grupie chorych dane cytometryczne porównano z oceną patomorfologiczną. W Tabeli 25 zamieszczono wartości współczynnika korelacji stopnia zapalenia, stopnia włóknienia oraz odsetka stłuszczenia wątroby u osób zakażonych.

**Tabela 25. Korelacja stopnia zapalenia, stopnia włóknienia oraz odsetka stłuszczenia wątroby u chorych.**

Badany antygen/receptor	Współczynnik korelacji		
	zapalenie G	włóknienie S	stłuszczenie %
NK CD107a+ [%]	0,0397	0,1132	-0,0329
NK CD107a- [%]	-0,0236	-0,0607	0,0679
MFI CD107a+	-0,0134	-0,0877	-0,1160
NK CD158b+ [%]	-0,0600	0,0962	0,0666
NK CD158b- [%]	0,0179	-0,1927	-0,0098
MFI CD158b+	-0,1369	-0,1270	0,1916
NK CD158i+ [%]	-0,0080	0,0131	-0,2420
NK CD158i- [%]	0,0662	0,0358	0,2673
MFI CD158i+	-0,0755	-0,0635	-0,0898
NK CD314+ [%]	-0,1268	-0,0046	-0,1597
NK CD314- [%]	0,1274	-0,0197	0,1950
MFI CD314+	<b>-0,3442</b>	<b>-0,4100</b>	0,0670
NK CD335+ [%]	-0,0095	-0,1251	-0,1009
NK CD335- [%]	-0,0155	0,0735	0,1263
MFI CD335+	-0,1439	-0,2922	0,1346
NK CD336+ [%]	0,0583	0,0870	0,0594
NK CD336- [%]	-0,1055	-0,1702	-0,0125
MFI CD336+	-0,0359	-0,0581	0,0279
NK CD337+ [%]	-0,0593	-0,1450	-0,0773
NK CD337- [%]	0,0585	0,1438	0,0777
MFI CD337+	-0,1221	-0,2810	0,0615
NK CD253+ [%]	0,0642	-0,1142	0,0447
NK CD253- [%]	-0,0487	0,1267	-0,0226
MFI CD253+	0,1455	0,1943	-0,1097
NK granzym B+ [%]	0,0552	0,0206	0,0400
NK granzym B- [%]	-0,0896	0,0030	-0,0179
MFI granzym B+	0,0695	-0,0238	-0,0214



Istnieje przeciętna ujemna korelacja między zapaleniem wątroby a MFI CD314 o współczynniku korelacji  $r=-0,3442$  oraz między tym samym markerem a włóknieniem o współczynniku korelacji  $r=-0,4100$ . Pozostałe korelacje wyrażają słabą siłę związku. Na Rycinie 22 przedstawiono wykres korelacji rang Spearmana dla MFI CD314 względem stopnia zapalenia i włóknienia wątroby u zakażonych HCV.



**Rycina 22.** Wykres korelacji rang Spearmana dla MFI CD314 względem stopnia zapalenia i włóknienia wątroby u zakażonych HCV.

#### 5.2.2.8. Porównanie wyników cytometrii z uwzględnieniem chorób współistniejących

Choroby współistniejące, o których mowa w poniższym porównaniu, to takie, które występowały niezależnie od zakażenia HCV. Wśród tych chorób najczęściej występowały schorzenia kardiologiczne i nowotworowe. W Tabeli 26 wyszczególniono jednostki chorobowe

występujące w grupie zakażonych HCV. Niejednokrotnie jeden pacjent miał udokumentowaną więcej niż jedną chorobę przewlekłą współistniejącą z zakażeniem HCV.

**Tabela 26. Jednostki chorobowe występujące w grupie zakażonych HCV.**

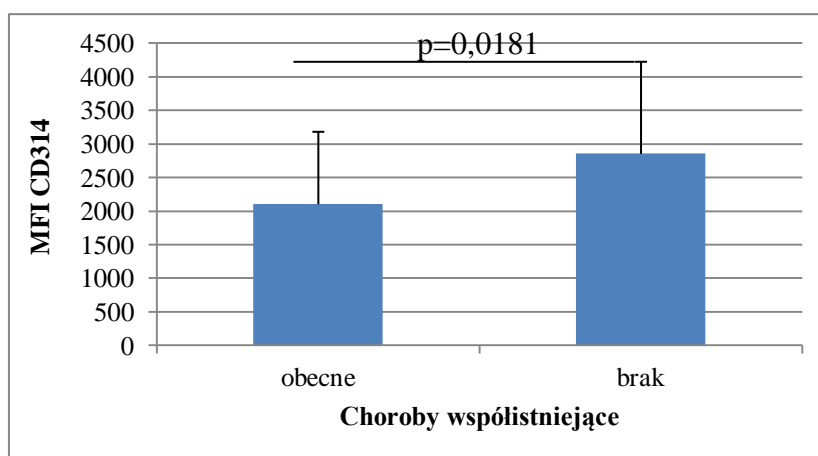
<b>Grupa chorób / jednostka chorobowa</b>	<b>Liczba pacjentów z daną chorobą współistniejącą</b>
Nadciśnienie tętnicze +/- inne obciążenia kardiologiczne	19
Choroby nowotworowe, w tym rak piersi, jajnika, ziarnica złośliwa	10
Kamica pęcherzyka żółciowego	8
Choroby nerek, w tym kamica nerkowa	7
Choroby tarczycy+ niedoczynność przysadki	7+1
Cukrzyca typu 2	3
Astma oskrzelowa+ POChP	2+1
Choroby kości i stawów (m.in. zespół Olliera)	7
Choroby naczyń (w tym przewlekła niewydolność żylna, udar niedokrwienny mózgu)	5
Choroby przewodu pokarmowego	3
Zespół depresyjny	2
Padaczka	3

Ponizej w Tabeli 27 przedstawiono wyniki dotyczące jedynie antygenów, dla których wykazano istotność statystyczną. Na Rycinie 24 przedstawiono wyniki badań antygeny CD314 w grupie osób z chorobą współistniejącą względem grupy chorych zakażonych HCV bez chorób dodatkowych.

**Tabela 27. Porównanie wyników cytometrycznych dla antygenu CD 314 u osób zakażonych HCV z chorobami współistniejącymi względem zakażonych bez chorób dodatkowych.**

CD314 a choroby współistniejące							
	Choroby współistniejące	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
NK CD314+ [%]	obecne	45	82,85	0,00	98,43	24,37	0,2994
	brak	53	89,54	0,00	98,57	13,93	
NK CD314- [%]	obecne	45	15,47	0,46	100,00	21,32	0,1787
	brak	53	8,35	0,00	27,91	6,18	
MFI CD314+	obecne	45	3065,73	0,00	7216,00	1505,74	0,0181
	brak	53	3797,45	0,00	7447,00	1556,71	

Nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy NK CD314+ [%] ( $p=0,2994$ ), NK CD314- [%] ( $p=0,1787$ ) a obecnością chorób towarzyszących. Istnieje statystycznie istotna różnica między wynikami MFI CD314+ dla osób z chorobą współistniejącą a wynikami pacjentów bez choroby towarzyszącej ( $p=0,0181$ ). Na Rycinie 23 przedstawiono zależność między wynikami MFI antygenu CD314 u osób z chorobą towarzyszącą a wynikami pacjentów bez choroby towarzyszącej.



**Rycina 23. Zależność między wynikami MFI CD314+ dla osób z chorobą współistniejącą a wynikami pacjentów bez choroby współistniejącej.**

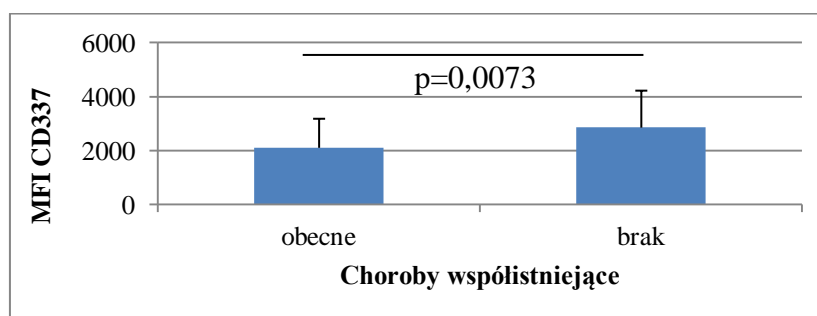
W Tabeli 28 przedstawiono wyniki dla antygenu CD 337 w grupie osób z chorobą towarzyszącą względem grupy chorych zakażonych HCV bez chorób współistniejących.

**Tabela 28. Porównanie wyników cytometrycznych dla antygenu CD 337 u osób zakażonych HCV z dodatkowymi chorobami towarzyszącymi względem zakażonych bez chorób towarzyszących.**

CD337 a choroby współistniejące							
	Choroby współistniejące	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
NK CD337+ [%]	obecne	45	67,89	0,00	97,36	21,96	0,0603
	brak	53	75,34	0,00	99,15	18,48	
NK CD337- [%]	obecne	45	30,96	2,64	100,00	21,51	0,0953
	brak	53	24,56	0,85	99,50	18,41	
MFI CD337+	obecne	45	2106,78	0,00	4113,00	1078,24	0,0073
	brak	53	2855,49	0,00	7264,00	1372,38	

Nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy NK CD337+ [%] ( $p=0,0603$ ), NK CD337- [%] ( $p=0,0953$ ) i obecnością chorób współistniejących dla receptora CD337. Istnieje statystycznie istotna różnica między wynikami MFI CD337+ dla osób z chorobą współistniejącą a wynikami pacjentów bez choroby ( $p=0,0073$ ).

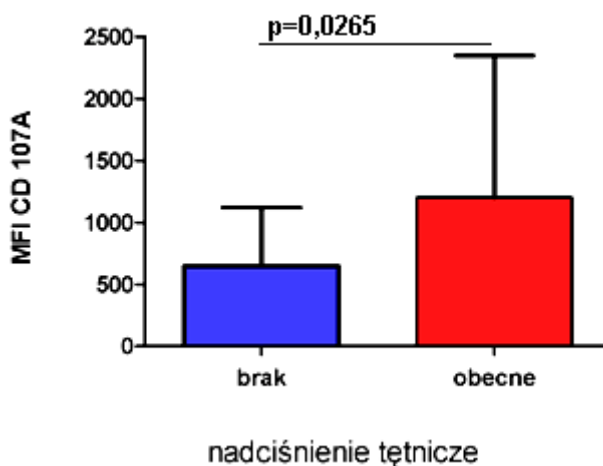
Na Rycinie 24 przedstawiono zależność między wynikami MFI antygenu CD335 u osób z chorobą towarzyszącą a wynikami pacjentów bez choroby towarzyszącej.



**Rycina 24. Zależność między wynikami MFI CD337+ dla osób z chorobą towarzyszącą a wynikami pacjentów bez choroby towarzyszącej.**

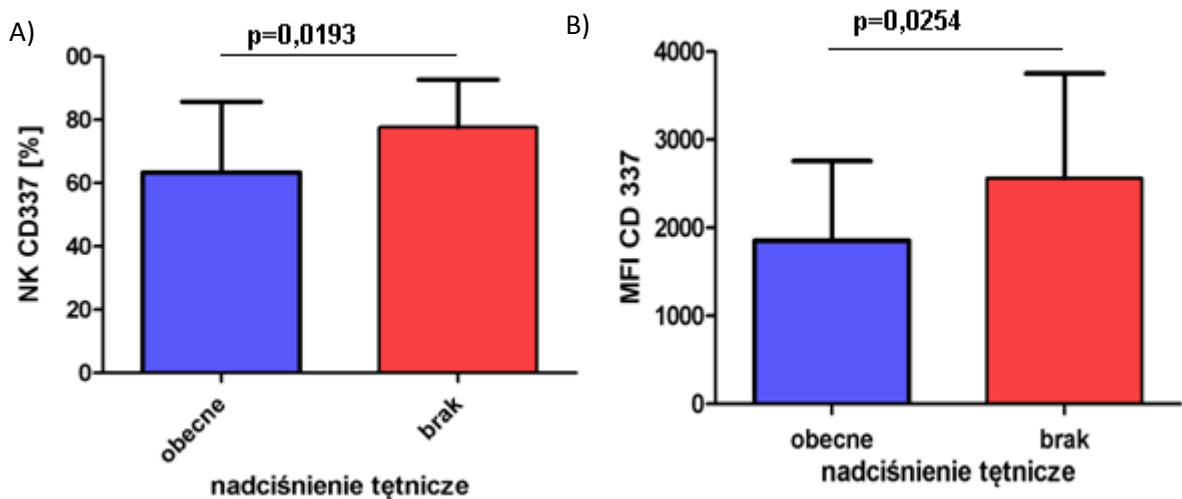
### 5.2.2.9. Porównanie wyników cytometrii w grupach z uwzględnieniem nadciśnienia tętniczego

Porównano zależności wyników laboratoryjnych i cytometrycznych w grupie HCV dodatniej z nadciśnieniem tętniczym - NT (n=19) względem wyników grupy HCV dodatniej bez chorób współistniejących (n=29). Z grupy badanych HCV+ wyodrębniono osoby z chorobami współistniejącymi, które powodują powstanie zapalenia niskiego stopnia w organizmie. Najczęściej występującą chorobą z tego kręgu było nadciśnienie tętnicze. Przeanalizowano dane cytometryczne w obu grupach – z występującym nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie bez dodatkowych obciążeń chorobowych. Poniżej przedstawiono wyniki, gdzie znaleziono istotne różnice. Pozostałych danych nie pokazano. Istotność statystyczną ( $p=0,0265$ ) wykazano dla MFI CD 107a pomiędzy badanymi grupami. Rozkład średnich wartości MFI CD107a w obu grupach przedstawiono na Rycinie 25.



**Rycina 25. Rozkład średnich wartości MFI CD107a w grupie, gdzie nie stwierdza się chorób współistniejących oraz w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym (NT)**

Istotność statystyczną wykazano dla NK CD 337 [%] ( $p=0,0193$ ) oraz dla MFI CD 337 ( $p=0,0254$ ) pomiędzy badanymi grupami. Na Rycinie 26 przedstawiono odpowiednio wyniki dotyczące odsetka komórek NK CD 337+ oraz MFI CD 337 w grupach z obecnym nadciśnieniem i w grupie bez dodatkowych chorób.



**Rycina 26. Wyniki dotyczące odsetka komórek NK CD 337+ (A) oraz MFI CD 337 (B) w grupach badanych.**

#### 5.2.2.10. Porównanie wyników cytometrii w grupach w zależności od czasu ekspozycji na HCV

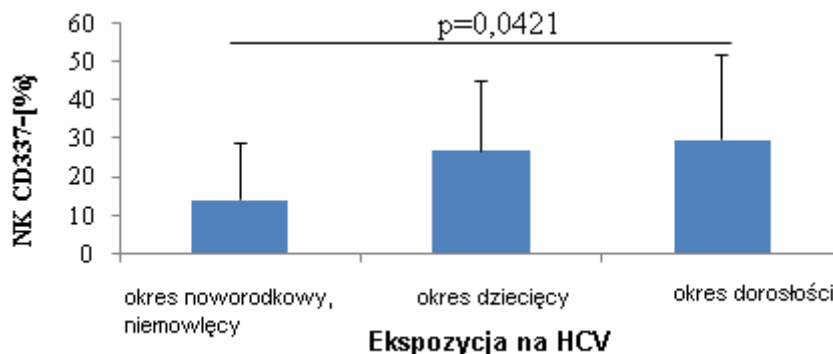
Porównano wyniki cytometrii przepływowej względem przypuszczalnego okresu ekspozycji na zakażenie HCV. Wyniki na poziomie istotności statystycznej przedstawiono w Tabeli 29.

**Tabela 29. Porównanie wyników dotyczących odsetka komórek NK CD 337+ w zależności od czasu ekspozycji na zakażenie.**

CD337 a ekspozycja na HCV							
	Ekspozycja [okres]	N	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
NK CD 337+ [%]	noworodkowy, niemowlęcy	7	85,58	53,88	95,62	14,64	0,0501
	dziecięcy	45	71,82	20,00	97,36	18,81	
	dorosłości	46	69,94	0,00	99,15	22,09	
NK CD 337- [%]	noworodkowy, niemowlęcy	7	14,27	4,38	46,12	14,74	<b>0,0486</b>
	dziecięcy	45	27,02	2,64	80,00	18,04	
	dorosłości	46	29,97	0,85	100,00	22,02	
MFI CD337	noworodkowy, niemowlęcy	7	2860,14	1731,00	3996,00	777,08	0,3645
	dziecięcy	45	2596,98	0,00	7264,00	1308,59	
	dorosłości	46	2375,24	0,00	5756,00	1347,69	

Wykazano istotność statystyczną ( $p=0,0486$ ) dla NK CD 337- [%]. Przy użyciu testu Kruskala – Wallisa wykazano statystycznie istotną różnicę między wynikami NK CD 337- [%] dla poszczególnych ekspozycji. W teście wielokrotnych porównań stwierdzono, że różnica ta istnieje

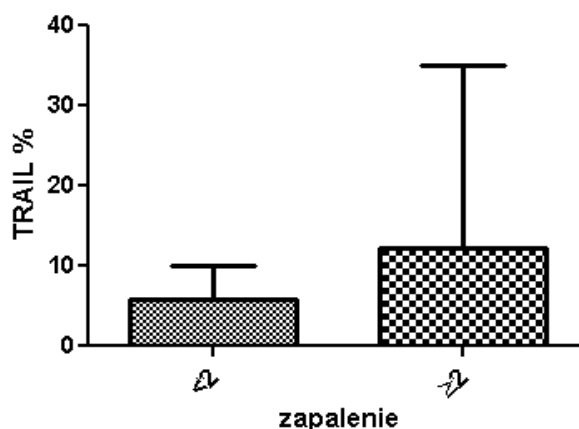
między ekspozycją w okresie dorosłości a ekspozycją w okresie noworodkowym i niemowlęcym ( $p=0,0421$ ). Zależność tę prezentuje Rycina 27.



**Rycina 27. Porównanie średnich wyników dla odsetka komórek NK CD 337- w zależności od okresu ekspozycji.**

#### 5.2.2.11. Porównanie wyników cytometrii w grupach zaawansowania zapalenia wątroby

Grupę HCV+ podzielono według stopnia zaawansowania zapalenia i włóknienia wątroby: o umiarkowanym stopniu ( $<2$ ) ( $n=35$ ) i znacznym ( $\geq 2$ ) ( $n=41$ ). Grupy porównano pod względem występowania poszczególnych receptorów komórek NK. Danych nie pokazano. Nie wykazano różnic na poziomie istotności statystycznej. Zaobserwowano natomiast wzrost ekspresji TRAIL w skojarzeniu z rosnącym zaawansowaniem zmian zapalnych w obrębie wątroby, co przedstawiono na Rycinie 28.



**Rycina 28. Ekspresja TRAIL w zależności o oceny patomorfologicznej.**

## 6. Omówienie wyników i dyskusja

Wirus zapalenia wątroby typu C – HCV jest wirusem o niezwykle mechanizmami uniku przed układem odpornościowym człowieka. Uniemożliwia to właściwą reakcję gospodarza na patogen, a także skonstruowanie skutecznej szczepionki. Wirus HCV jest wirusem bardzo zmiennym, rozmieszczenie jego genotypów zmienia się wraz z długością i szerokością geograficzną, a na jego naturalną historię ma wpływ wiele czynników, choćby takich jak rasa, pewne nawyki behawioralne przypisane konkretnym grupom ludzi, itp. Niezmiennie wirus HCV stanowi duże zagrożenie epidemiologiczne. Mimo zwiększenia się świadomości społeczeństwa w temacie dróg zakażenia tym patogenem, liczba zakażonych rośnie. Według Polskiej Grupy Ekspertów HCV wirusem tym może być zakażonych nawet 1,9% Polaków. Corocznie zakażają się 3-4 mln osób na świecie. Dane te mogą być niedoszacowane. Zakażenie przez długi okres jest bezobjawowe. Wielokrotnie ujawnia się dopiero pod postacią powikłań lub jest diagnozowany w sposób przypadkowy. Obraz choroby nie jest wynikiem bezpośredniego działania cytopatycznego wirusa, ale pozostaje w ścisłym związku z oddziaływaniem układu immunologicznego człowieka z HCV. Znajduje to odzwierciedlenie w odmienności obrazu subpopulacji leukocytów we krwi obwodowej u zakażonych.

Zarówno rosnące zainteresowanie wrodzonym mechanizmem układu immunologicznego jak i coraz to większe możliwości diagnostyczne oraz potrzeba nowych informacji w obliczu rosnącego problemu epidemiologicznego stały się inspiracją do opracowania tego tematu. Celem pracy było znalezienie korelacji pomiędzy fenotypem komórek NK – komponenty komórkowej odpowiedzi wrodzonej- a stanem klinicznym zakażonych HCV w porównaniu z grupą kontrolną. Poszukiwano wzajemnych zależności wyników cytometrycznych, ekspresji antygenów na komórkach NK do wieku, okresu zakażenia, wysokości wirēmii, parametrów laboratoryjnych, obrazu patomorfologicznego i chorób współistniejących.

Badanie tych zależności jest w ostatnim okresie przedmiotem wielu znakomych prac. Pomimo prowadzenia podobnych badań w wielu ośrodkach na świecie, każde z nich może prowadzić do odmiennych wniosków z uwagi na wiele zmiennych wpływających na patogenezę PZWC. Rola komórek NK w PZWC została już dość dobrze poznana, ale nadal brakuje danych, jak ekspresja receptorów komórek NK zmienia się w odniesieniu do stanu klinicznego osoby zakażonej. Analiza tych danych może prowadzić do bliższego poznania niezwykle heterogenicznej natury wirusa, a w dalszych rozważaniach do celniejszego i bardziej skutecznego postępowania diagnostycznego i terapeutycznego.



**Ogólna charakterystyka grupy badanej.** W pracy przedstawiono wyniki badań 98 chorych z udokumentowanym zakażeniem HCV ze pomocą badań serologicznych oraz genetycznych. Zakażeni nie byli wcześniej leczeni przeciwwirusowo. Z grupy tej wykluczono osoby, u których dodatkowo stwierdzono komponentę autoimmunizacyjną choroby wątroby, nowotwór wątroby oraz osoby zakażone innymi wirusami hepatotropowymi. Badanie dotyczyło wyłącznie osób dorosłych, niemniej jednak u znacznej części pacjentów wykazano istotne czynniki narażenia na zakażenie wirusem HCV już we wczesnym okresie niemowlęcym a nawet noworodkowym. U większości chorych rozpoznano genotyp 1b wirusa HCV, co jest potwierdzeniem opisywanej w piśmiennictwie przeważającej częstości tego genotypu w Europie <sup>116</sup>. Obserwowano wysoką replikację wirusa oraz średniozaawansowane włóknienie i zapalenie w bioptacie wątroby a także wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej u większości chorych w grupie badanej. W grupie zakażonych (vs. grupa kontrolna) istotnie obniżona była liczba leukocytów we krwi obwodowej, w związku z tym zaznaczała się także tendencja spadkowa liczby komórek NK (0,18 vs. 0,23 [tys./ $\mu$ L]). Grupę kontrolną stanowili zdrowi, niezakażeni wolontariusze (n=13), u których wykluczono zakażenie wirusami hepatotropowymi w oparciu o badanie serologiczne. Grupa ta była nieliczna, ale wystarczająca do uzyskania istotności statystycznej.

**Dobór receptorów i ligandów do badań.** W niniejszej pracy przedstawiono wyniki dotyczące antygenów CD107a, CD158b, CD158i, CD314, CD335, CD336, CD337, granzymu B oraz CD253 komórek NK (CD56+, CD16+, CD3-). Receptory dobrano w ten sposób, żeby należały do różnych grup receptorów komórek NK (KIR, NCR, receptory lektynopodobne) o różnym potencjale funkcjonalnym – aktywującym lub hamującym.

**Ogólna ocena wyników badań.** W powyżej wymienionych badaniach znaleziono pojedyncze różnice o cechach istotności statystycznej pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. Zazwyczaj obserwowano wzrost ekspresji receptorów aktywujących komórek NK i MFI w grupie osób zakażonych w porównaniu z grupą kontrolną, co świadczy o znaczeniu tych receptorów w stanie zwiększonej aktywności zapalnej organizmu w obliczu zakażenia. Wykazano kilka przeciętnych korelacji pomiędzy ekspresją receptorów, MFI a stanem klinicznym chorych.

#### **Szczegółowe omówienie wyników niniejszej pracy.**

**Spadek liczby komórek NK i leukopenia w grupie badanej.** Zaznaczał się wyraźny spadek odsetka komórek NK w linii komórek limfoidalnych, komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononucleated cell* - PBMC) w grupie chorych. Procent

komórek NK wynosił w grupie badanej 6,661 vs. 7,931 w grupie kontrolnej. W piśmiennictwie również stwierdzono, że w trakcie przewlekłego zakażenia liczba komórek NK we krwi obwodowej zmniejsza się w stosunku do tego parametru obserwowanego u osób zdrowych<sup>82</sup>. Jednak podobnie jak w pracach innych badaczy nie wykazano istotności statystycznej w odniesieniu do parametrów klinicznych<sup>76, 117</sup>

Wykazano różnice o cechach istotności statystycznej ( $p=0,0304$ ) dla liczby leukocytów u chorych w stosunku do grupy kontrolnej. W przebiegu zakażenia HCV cytopenię obserwuje się zazwyczaj jako działanie niepożądane leczenia przeciwwirusowego, ale opisuje się również cytopenię występującą u pacjentów naiwnych, co niejednokrotnie uniemożliwia podjęcie działania terapeutycznego. Obecnie podaje się trzy możliwości powodowania tego zaburzenia: zaburzenia autoimmunizacyjne, bezpośredni wpływ samego wirusa oraz hipersplenizm w przebiegu nadciśnienia wrotnego<sup>30</sup>. Ze względu na to, że z grupy badanej wykluczono chorych z dodatnimi autoprzeciwciałami, a także ze względu na stosunkowo słabo nasilone zmiany w obrazie klinicznym, należy sądzić, że cytopenia jest w tym przypadku głównie skutkiem działania wirusa.

#### **Ekspresja poszczególnych receptorów czynnościowych komórek NK w przebiegu zakażenia HCV w grupie badanej.**

**Receptor NKG2D** (CD314) jest receptorem aktywującym i kostymulującym występującym na komórkach NK, komórkach T CD8+ i CD4+. Należy do rodziny receptorów lektynowych typu C, jest białkiem przez błonowym, dla którego ligandami są głównie białka stresu komórkowego MICA, MICB i ULBP. Ekspresja tych ligandów jest zwiększona na komórkach zakażonych oraz nowotworowych<sup>118</sup>. W badaniach niniejszej pracy wykazano istotną statystycznie różnicę między wynikami MFI dla receptora CD314 osób chorujących przewlekle a wynikami pacjentów bez choroby współistniejącej. Podobne doniesienia przedstawili Xia M. i wsp., którzy podali, że aktywacja immunologiczna w osi NKG2D/ligand (ligand - białka stresu komórkowego) może promować zaburzenia metaboliczne, powodować zapalenie wątroby i potencjalnie innych tkanek<sup>119</sup>. Chorzy z grupy badanej oprócz przewlekłego zapalenia wątroby typu C najczęściej mieli udokumentowane choroby takie jak.: zespół metaboliczny, cukrzycę typu 2, choroby układu pokarmowego i moczowego. Znajduje to odzwierciedlenie w aktualnym piśmiennictwie, które opisuje znaczącą rolę receptora NKG2D i/lub jego ligandów w chorobach zapalnych i autoimmunizacyjnych takich jak.: choroby przewodu pokarmowego (celiakia, zapalenie jelita grubego), cukrzyca typu 1, przewlekła obturacyjna choroba płuc, zespół metaboliczny związany z cukrzycą typu 2 i wiele innych. Znaczenie tego receptora w prozapalnej stymulacji organizmu

w badaniu własnych potwierdza dodatkowo korelacja MFI NKG2D na komórkach NK z MFI innych receptorów aktywujących – CD107a i CD335, a także korelacja odsetka NK CD314+ z CD335 i CD337, receptorami NCR. Dodatkowo siła tych korelacji rośnie w grupie chorych z wyższą replikacją w stosunku do badania w całej grupie HCV+. Stłuszczenie wątroby wpływa na zmniejszenie liczby komórek NK, a aktywacja komórek NK sprzyja hamowaniu zmian włóknistych w wątrobie, co sumując daje progresję włóknienia pod wpływem stłuszczenia wątroby <sup>108</sup>. Być może próba aktywowania komórek NK, może np. pod postacią szczepionki idiotypowej u osób zakażonych HCV rzucałoby nowe światło na strategię profilaktyczną w zakresie aktywacji zapalenia i włóknienia wątroby. Należy jednak przeprowadzić wiele badań, żeby móc zbliżyć się do tak daleko idących rozważań. Opisano się doświadczalne skuteczne użycie przeciwciał przeciwko NKG2D u myszy w prewencji cukrzycy typu 1, zapaleniu stawów i chorób zapalnych jelit. Podobne badanie przeprowadzono u myszy z miażdżycą i zapaleniem wątroby na tle niealkoholowego stłuszczenia wątroby <sup>120</sup>. Może przyszłość przyniesie możliwość użycia takich przeciwciał także w profilaktyce poekspozycyjnej zakażenia HCV? Ostatnio opisano zwiększoną ekspresję NKG2D na komórkach cytotoksycznych, występujących głównie w przestrzeniach wrotnych utkania wątrobowego u ludzi zakażonych HCV przed leczeniem. Zwiększona ekspresja NKG2D korelowała istotnie ze zwiększoną aktywnością aminotransferaz oraz ze zmianami zapalnymi bioptatu wątroby <sup>121</sup>. Istotne statystycznie wyniki badań bieżącej pracy dotyczą jednak oceny ilościowej receptora CD314 komórek NK krwi obwodowej a nie NK wewnątrzwątrobowych. Być może utkanie wątroby, u osób zakażonych HCV, rządzi się innymi prawami, stąd odmienne wyniki w tym opracowaniu - przeciętna ujemna korelacja między zapaleniem i włóknieniem wątroby a MFI CD314. Niektóre prace podają zbieżne wyniki. W pracy Mani A. i wsp., opisywano zmniejszoną ekspresję receptorów NKG2D na komórkach NK krwi obwodowej, co wiązano z faktem spadku ekspresji ligandu dla tego receptora – HLA klasy I typu A, poza tym – z działaniem TGF- $\beta$ , prozapalną cytokiną uwalnianą przez komórki Kupffera i HSC <sup>108</sup>. Po 18 godzinach inkubacji komórek NK z komórkami zakażonymi HCV również opisywano zmniejszenie się ekspresji NKG2D, natomiast w pracy Holder'a po 5 godzinach inkubacji nie znaleziono różnicy w ekspresji tego receptora na komórkach zakażonych w porównaniu do komórek zdrowych <sup>101,122,123</sup>.

**NKp30 (CD337)** jest jednym z receptorów naturalnej cytotoksyczności (NCRs). W obecnej pracy wykazano, że istnieje statystycznie istotna różnica między wynikami MFI CD337 dla osób z chorobą towarzyszącą a wynikami pacjentów bez choroby (p=0,0073). Niższe MFI opisano w grupie z chorobami towarzyszącymi, których krótką charakterystykę podano w tekście

dotyczącym NKG2D. Podobne tendencje obserwowano w grupie HCV+ z nadciśnieniem tętniczym. Według aktualnego piśmiennictwa, spadek ekspresji NCRs odpowiada za zmniejszenie zdolności cytotolitycznych komórek NK. Wykazano, że, po 5-godzinnej inkubacji *in vitro* komórek zakażonych wirusem HCV vs. komórki niezakażone, że na tych pierwszych zmniejsza się ekspresja receptora NKp30 o  $18 \pm 4,5\%$  (MFI)<sup>122</sup>. W niniejszej pracy odsetek komórek NK CD337+ również był niższy w grupie zakażonych vs. grupa kontrolna. Różnica nie była jednak istotna statystycznie. Zakażenie HCV wpływa na zwiększenie ligandu dla receptora NKp30, który oprócz funkcji aktywującej komórek NK działa także antagonistycznie do tej funkcji poprzez równoczesne zmniejszenie ADCC - cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ang. *Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*, ADCC) przez wpływ na CD16<sup>122</sup>. Według niektórych autorów podobne różnice ekspresji NCRs w grupie osób chorujących na inne schorzenia wątroby, sugeruje brak związku spadku ekspresji NCRs konkretnie z zapaleniem wątroby na tle zakaźnym<sup>122,123</sup>. Nie wszyscy autorzy są jednak podobnego zdania co do spadku NCRs<sup>122-124</sup>. W obecnie rozważanej pracy obliczono również, że odsetek komórek NK CD337- jest większy w grupie potencjalnie późnych ekspozycji na zakażenie (wieku >18 r.ż) względem osób prawdopodobnie ekspozowanych już w okresie noworodkowym i niemowlęcym ( $p=0,0421$ ), tym samym odsetek komórek NK CD337+ jest większy w grupie ekspozowanych w okresie niemowlęcym względem potencjalnie późnych ekspozycji na zakażenie. Różnica ta jest oceniana na granicy istotności statystycznej ( $p=0,0501$ ). Dane, na których oparto tę analizę, są jednak danymi wnioskowanymi na podstawie okresu potencjalnej ekspozycji na zakażenie (transfuzje krwi, przebyte operacje, wywiad rodzinny itp.), ponieważ czas zakażenia dla większości chorych był nieznany, a wykrycie zakażenia przypadkowe i nie poprzedzone objawami ostrego zakażenia HCV. Niemniej jednak wzrost tego parametru w grupie potencjalnie dłużej zakażonej, wskazuje na zachowany potencjał cytotoksyczny komórek NK także w wieloletnim zakażeniu przewlekłym. W świetle badań w grupie pediatrycznej, wydaje się, że sam okres ekspozycji na zakażenie ma istotne znaczenie w kontekście rozwoju układu odpornościowego człowieka. Uważa się, że u dzieci przeważa aktywujący fenotyp komórek NK, prawdopodobnie w późniejszym okresie życia wzrasta ekspresja receptorów hamujących, a tym samym zmniejsza się zdolność komórek NK do hamowania procesów uszkodzenia wątroby. Wymaga to wciąż potwierdzenia w dalszych badaniach<sup>108</sup>.

**NKp46 (CD335).** Jest antygenem występującym wyłącznie na komórkach NK, przez co przeciwciała anti-CD335 wykorzystuje się w celu precyzyjnej identyfikacji komórek NK<sup>125</sup>. Również w niniejszej pracy wspomniane przeciwciała posłużyły do oceny komórek NK. Zbadano,

że odsetek NK 335+ korelował z odsetkiem NK NKG2D+, a MFI CD335 korelowało z MFI TRAIL. Badacze różnych ośrodków są niezgodni co do ekspresji receptorów naturalnej cytotoxyczności, a także co do ekspresji NKG2D. Jednak zazwyczaj opisuje się ich nadekspresję w przebiegu zakażenia<sup>82</sup>. Stwierdzono natomiast że u chorych z niższą koekspresją niektórych receptorów komórek NK - NKp30(+), NKp46(+) i NKG2D(+) częściej dochodziło do klirensu HCV<sup>100</sup>. W związku z czym wyższa ich ekspresja jest obserwowana u zakażonych przewlekle. U osób z grupy HCV+ z niską wiremią w badaniu niniejszej pracy, MFI CD335 było istotnie statystycznie wyższe w stosunku do osób z wysoką wiremią. Ponadto w całej grupie HCV+ MFI CD335 korelowało z MFI TRAIL, co może być wykładnikiem indukcji śmierci komórki zakażonej. W pracy Sivori, S. opisano zwiększone wydzielanie jonów wapnia, zwiększoną aktywność cytolityczną (niezależnie od MHC) oraz indukcję produkcji cytokin przez komórki NK za sprawą pobudzenia receptora NKp46<sup>125</sup>. Prawdopodobnie takie pobudzenie receptora NKp46 i wzrost jego ekspresji w grupie badanej, poprzez wpływ na lizę zakażonych komórek docelowych, może mieć wpływ na redukcję wiremii.

**LAMP-1.** Błonowe białko 1 związane z lizosomem (ang. *lysosomal-associated membrane protein-1* (CD107a) wyściela błony ziarnistości cytolitycznych<sup>126</sup>. Istotność statystyczną w badaniach niniejszej pracy wykazano dla odsetka komórek NK wykazujących ekspresję CD107a u zakażonych HCV względem kontroli (p=0,0483). U osób chorych ekspresja tego receptora na komórkach NK jest większa aniżeli u kontroli. Potwierdza to rolę CD107a jako markera aktywności, degranulacji, komórek NK<sup>127</sup>. W pracy Aktas E. i wsp. wykazano znaczący wzrost ekspresji CD107a na powierzchni komórek NK pod wpływem stymulacji, co korelowało istotnie z wydzielaniem cytokin (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) oraz z lizą komórek docelowych<sup>128</sup>. Ponadto w badaniach obecnej pracy sugeruje się związek MFI CD107a + ze wzrostem aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT). Według najnowszych doniesień degranulacja limfocytów w wątrobie, obserwowana na podstawie CD107a, była znacząco wyższa u osób z genetycznym wariantem interferonu- $\lambda$ 4 rs1297860 preferowanego genotypu CC. Pokrywało się to również z wczesną odpowiedzią na terapię dwulekową u tych chorych. Ponadto aktywność aminotransferazy alaninowej była zależna od poziomu CD107a<sup>129</sup>. Z dodatkowych znalezisk tej rozprawy należy wymienić korelacje z receptorami aktywującymi CD158i[%] a także z MFI CD314. Co więcej siła tych korelacji rosła w grupie z wysoką wiremią (powyżej 100 000 IU/ml) w porównaniu z całą grupą HCV+. Oznacza to, że wraz z rosnącą replikacją wirusa, ujawnia się funkcja efektorowa komórek NK, ponieważ funkcja aktywująca receptorów NK przewyższa sygnał hamujący<sup>130</sup>. Szukano również czynników o potencjale prozapalnym, mogących modyfikować ekspresję

CD107a. Z grupy HCV+ wyodrębniono chorych ze współistniejącymi chorobami zapalnymi. Najbardziej reprezentatywną grupą były osoby chorujące dodatkowo na nadciśnienie tętnicze. W grupie tej wzrost MFI CD107a na komórkach NK był istotny statystycznie w porównaniu z osobami jedynie zakażonymi HCV. Z piśmiennictwa wynika, że choroby powodujące zapalne niskiego stopnia, jakim jest nadciśnienie tętnicze aktywują monocyty i makrofagi, tym samym stymulując komórki NK do uwalniania cytokin; indukują stres oksydacyjny<sup>131</sup>. W związku z tym odpowiedź wrodzona może wpływać na rozwój i progresję nadciśnienia tętniczego. Idąc dalej, zapalenie niskiego stopnia może modyfikować aktywność komórek NK w *hepatitis C*.

**KIR2DL2 (CD158b)** należy do rodziny receptorów KIR immunoglobulinopodobnych o potencjale hamującym. W wynikach niniejszej pracy obserwowano spadek MFI CD158b u chorych HCV + z wiremią rzędu powyżej 100 000 IU/ml i jednocześnie obserwowano tendencję wzrostową MFI tego receptora hamującego komórki NK w przypadku replikacji poniżej 100 000 IU/ml. Może być to odzwierciedleniem: zwiększonej aktywności komórek NK, które nie są hamowane przez CD158b; wzrostu lizy komórek docelowych, a tym samym ograniczenia replikacji wirusa. Uważa się, że jeśli dominują interakcje KIR hamujących z odpowiednim ligandem HLA, wówczas funkcja komórek NK jest zaburzona, a zakażenie HCV staje się przewlekłe<sup>130</sup>. Opisuje się rolę KIR w odpowiedzi na leczenie w skojarzeniu z odpowiednim haplotypem HLA. Jednak sama częstość receptora CD158b przed leczeniem korelowała negatywnie z uzyskaniem SVR w pracy Golden-Mason'a<sup>114</sup>.

#### **Ocena wydzielania granzymu B i TRAIL w przebiegu zakażenia HCV w grupie badanej.**

**Granzym B** (enzym związany z ziarnistościami – ang. *granule-associated enzymes*), proteaza serynowa o aktywności tryptazy<sup>132</sup>, jest magazynowany w ziarnistościach litycznych limfocytów cytotoksycznych (głównie limfocytów cytotoksycznych T, komórek NK, komórek zabójców aktywowanych limfokina (LAK, ang. *Lymphokine-activated killer cells*)<sup>133</sup>. Z wyników badań bieżącej pracy wynika, że w grupie chorych MFI granzymu B jest istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną ( $p=0,0116$ ), ponadto rośnie w grupie HCV+ z aktywnością AST powyżej normy. Główną rolą granzymu B jest indukcja śmierci komórki docelowej<sup>132,133</sup>. Wykazano również, że granzymy mają działanie bezpośrednio antywirusowe poprzez rozszczepianie czynników wirusowych jak i ze strony komórek gospodarza, uczestniczących w namnażaniu się wirusa, jego ataku czy też latencji<sup>132</sup>. Może też rozszczepiać białka istotne w cyklu życiowym komórki, jej homeostazie, prowadząc do apoptozy komórkę, która nie była do tego przeznaczona. W związku z powyższym rozpoznawanie komórki może być niewybiórcze.

Przyczyną tego może być m.in. zjawisko mimikry molekularnej RNA zawartego w rybonukleoproteinie, gdzie jest on rozpoznawany przez PRR jako PAMP, co aktywuje odpowiedź wrodzoną<sup>132</sup>. Być może należałoby w dalszych badaniach ocenić możliwość zwiększenia produkcji granzymu B, ale wybiórczo wyłącznie wobec komórek zakażonych. Zaobserwowano, że mutacje w *loci* genu dla granzymu B poważnie uszkadzają cytotoksyczność limfocytów<sup>133</sup>. Co potwierdza rolę granzymu w cytotoksyczności m.in. komórek NK w warunkach stymulacji (tu HCV). Ponadto w grupie chorych MFI granzym B korelował z wiekiem. Może być to związane z bombardowaniem organizmu przez różne antygeny, toksyny, których z wiekiem potencjalnie przybywa. Ponadto w grupie badanej wiek wielokrotnie przekładał się na długość czasu zakażenia wirusem, jednak korelacja ta nie nosiła znamion istotności statystycznej.

**TRAIL.** W rodzinie ligandów TNF (ang. *Tumor necrosis factor*) wyróżnia się TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) – ligand indukujący apoptozę związaną z TNF $\alpha$ . TRAIL uczestniczy w apoptozie i to głównie w warunkach patofizjologii<sup>134,135</sup>. Wyniki niniejszej pracy wykazują wzrost odsetka komórek NK TRAIL+ we krwi obwodowej chorych zakażonych HCV vs. grupa kontrolna na poziomie istotności statystycznej. Ekspresja TRAIL na komórkach mieloidalnych i limfoidalnych w wątrobie bezpośrednio odpowiada za śmierć hepatocytów w zapaleniu wątroby<sup>136</sup>. Wiąże się z receptorami śmierci DR4 i 5<sup>134</sup>. Powyższe receptory odgrywają znaczącą rolę w patogenezie chorób naczyniowych, nowotworowych i zakaźnych. Oprócz niewątpliwiej roli w zakażeniu HCV, opisywano udział TRAIL w zakażeniu HBV, CMV, HIV i w zakażeniu adenowirusowym<sup>137</sup>.

W kontekście zakażenia wątroby, jej uszkodzenia czy marskości obserwowano wzrost ekspresji odsetka NK TRAIL + szczególnie w przestrzeniach okołowrotnych wraz ze stopniem zaawansowania zapalenia wątroby u HCV+, co może być wskaźnikiem progresji choroby wątroby<sup>137</sup>. Być może TRAIL w związku z tym mógłby być dobrym biomarkerem nieinwazyjnym postępowania choroby wątroby<sup>134</sup>. Omawiana powyżej analiza badań wskazuje jednak na brak korelacji odsetka komórek NK TRAIL+ względem czasu trwania zakażenia HCV. Wbrew doniesieniom literaturowym znaleziono natomiast przeciętną ujemną korelację między odsetkiem komórek NK TRAIL+ a aktywnością AST o współczynniku korelacji  $r=-0,3014$ . Co oznaczałoby, że wraz ze wzrostem aktywności AST, maleje MFI CD253, co odpowiada spadkowi ekspresji TRAIL. Oczywiście AST nie jest wyznacznikiem progresji choroby, ale pośrednio wskazuje na aktywność zapalną toczącą się w wątrobie. Jednak w porównaniu z progresją zapalenia w materiale biopsyjnym badanej grupy HCV+ zaobserwowano wzrost ekspresji TRAIL. Różnica ta nie była jednak istotna statystycznie.

## 7. Wnioski

1. W przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu C (PZWC) dochodzi do wzrostu aktywacji komórek NK przy jednoczesnym spadku ich liczby.
2. Ekspresja i koekspresja receptorów komórek NK zależy od wirerii.
3. W przebiegu PZWC wzrasta potencjał cytotoksyczny komórek NK.
4. Obecność chorób współistniejących w przebiegu PZWC wpływa na spadek ekspresji wybranych receptorów komórek NK.



## 8. Streszczenie

Wstęp: Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C (PZWC) jest obecnie jedną z ważniejszych przyczyn marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego. Badania ostatnich lat w dziedzinie hepatologii jasno wskazują na kluczową rolę odpowiedzi immunologicznej w patogenezie tej choroby. Szczególne zainteresowanie budzi wpływ odpowiedzi wrodzonej w PZWC. Przedmiotem badań własnych są komórki NK, stanowiące subpopulację komórek odpowiedzi wrodzonej, która w przebiegu PZWC pełni istotną rolę w eliminacji komórek zakażonych. Eliminacja ta zależy od potencjału cytotoksycznego komórek NK, który jest pochodną aktywności ich receptorów czynnościowych oraz odpowiadających im ligandów.

Założenia badań: Celem pracy było znalezienie korelacji ekspresji receptorów czynnościowych na komórkach NK względem danych klinicznych chorych. Poszukiwano różnic fenotypowych komórek NK pomiędzy grupą chorych a grupą kontrolną a także czynników klinicznych modyfikujących ekspresję receptorów komórek NK.

Materiał i metody: Badaniem objęto zakażonych HCV (n=98) obu płci, wieku od 20 do 67 lat, z udokumentowanym zakażeniem HCV, przed leczeniem przeciwwirusowym. Grupę kontrolną stanowiły osoby niezakażone HCV (n=13). Populację komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) poddawano reakcji ze znakowanymi fluorochromem przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko receptorom komórek NK, następnie wykonano akwizycję komórek wykorzystując cytoflorymetr FACSCanto (BD) i oceniano ekspresję receptorów w programie FACS Diva 6.2.1. W badaniu wzięto pod uwagę receptory należące do trzech głównych grup receptorów komórek NK: receptory immunoglobulinopodobne (KIR), receptory lektynopodobne, receptory naturalnej cytotoksyczności (NCR). Ponadto oceniano ekspresję antygeny TRAIL i granzymu B.

Wyniki: Istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ) w ekspresji receptorów komórek NK wykazano w większości badanych grup receptorów pomiędzy chorymi a grupą kontrolną. Zwiększona ekspresja w grupie chorych dotyczyła głównie receptorów aktywujących (np. NKG2D, NKp30). Wykazano zależności ekspresji badanych antygenów od wysokości wiremii, aktywności aminotransferaz, a także od stopnia zapalenia i włóknienia wątroby. Zauważono również, że prawdopodobny okres ekspozycji na zakażenie HCV wiąże się ze stopniem ekspresji wybranych antygenów i receptorów komórek NK. Obecność chorób współistniejących okazała się mieć negatywne powiązania z aktywnością komórek NK.

Wnioski: W przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu C (PZWC) dochodzi do wzrostu aktywacji komórek NK przy jednoczesnym spadku ich liczby. Ekspresja i koekspresja receptorów komórek NK zależy od wirerii. W przebiegu PZWC wzrasta potencjał cytotoksyczny komórek NK. Obecność chorób współistniejących w przebiegu PZWC wpływa na spadek ekspresji wybranych receptorów komórek NK.

## 9. Summary

Introduction: *Chronic hepatitis C (CHC) is one of the major causes of the liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Numerous studies conducted in hepatology, clearly demonstrate the key role of the immune response in the pathogenesis of the disease. Particular interest is the impact of innate response in CHC. The object of own studies are NK cells constituting subpopulations of the innate response, which in CHC course plays an important role in the elimination of infected cells. Elimination is dependent on the cytotoxic potential of NK cells, which is a derivative functional activity of their receptors and the corresponding ligands.*

Purpose of the thesis: *Purpose of the study was the search for the correlation between expression of functional receptors on NK cells and the clinical data of patients. NK cell phenotypic difference between the patients and the control group as well as clinical factors modifying the expression of NK cell receptors was studied.*

Material and methods: *The study was performed among 98 HCV-infected patients, of both sex, aged 20 to 67 years, with documented HCV infection, prior to antiviral therapy. Control group consisted of individuals not infected with HCV (n = 13). The population of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was subjected to react with anti-NK cell receptor fluorochrome-labeled monoclonal antibodies. Then acquisition of the cells was performed using cytofluorometer FACSCanto (BD) and the receptor's expression was assessed by FACS Diva 6.2.1 program. The study took into consideration the receptors belonging to the three major groups of NK cell receptors: immunoglobulin-like receptors (KIR), lectin-like receptors, natural cytotoxicity receptors (NCR). Assayed for expression of TRAIL antigen and granzyme B.*

Results: *Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were demonstrated in the most of tested groups of receptors between patients and the control group. Increased expression in infected patients principally concerned activating receptors (e.g., NKG2D, NKp30). Correlation has been found between the expression of the studied antigens, viral load, aminotransferase activity, the range of inflammation and fibrosis of the liver. It was also noted that probable duration of the exposure to HCV infection is associated with expression's degree of antigens and NK cell receptors. Comorbidities' presence has proved negative relationship with the activity of NK cells.*

*Conclusions: Increase in NK cell activation with reduction in the number of NK cells is observed in the course of chronic hepatitis C (CHC). Expression and coexpression of NK cell receptors depend on viral load. The cytotoxic potential of NK cells increases in CHC course. The presence of comorbidities in HCV-infected patients affects the decrease in expression of selected NK cell receptors.*

## 10. Piśmiennictwo

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. **Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.** *Science.* 1989;244:359-62.
2. Pawełczyk A, Kubisa N, Jabłńska J, et al. **Detection of hepatitis C virus (HCV) negative strand RNA and NS3 protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMC): CD3+, CD14+ and CD19+.** *Virology.* 2013;10:346-51.
3. Timm J, Roggendorf M. **Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy.** *World J Gastroenterol.* 2007;13:4808-17.
4. Golden-Mason L, Rosen HR. **Natural killer cells: multifaceted players with key roles in hepatitis C immunity.** *Immunol Rev.* 2013;255:68-81.
5. Nakano T, Lau GM, Sugiyama M, Mizokami M. **An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region.** *Liver Int.* 2012;32:339-45.
6. Mania A, Kaczmarek M, Mozer-Lisewska I, Kowala-Piaskowska A, et al. **Hepatic stellate cells (HSC) cell line (LX-2) and Toll-like receptors – phenotypic/mRNA expression and in vitro functional studies.** *Centr Eur J Immunol.* 2013;38:486-93.
7. Simmonds P. **Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on.** *J Gen Virol.* 2004;85:3173-88.
8. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. **The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe.** *J Hepatol.* 2008;48:148-62.
9. Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, et al. **Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection.** *Immunol Cell Biol.* 2007;85:24-32.
10. Kato N. **Molecular virology of hepatitis C virus.** *Acta Med Okayama.* 2001;55:133-59.
11. Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, et al. **Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation.** *Gastroenterology.* 2004;127:1513-24.
12. Chung H, Watanabe T, Kudo M, Chiba T. **Hepatitis C virus core protein induces homotolerance and cross-tolerance to Toll-like receptor ligands by activation of Toll-like receptor 2.** *J Infect Dis.* 201;202:853-61.
13. Mozer-Lisewska I, Kowala-Piaskowska A, Bura M, Adamek A, et al. **Tissue localization of NS3 protein and NK cells in HCV infected liver biopsies.** *E & C Hepatology.* 2013;9:23-6.
14. Mauss S BT, Rocktroh J, Sarrazin C and Wedemeyer H. **Short guide to hepatitis C;** Flying Publisher, 2013; 18-40.
15. Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. **The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies.** *Gastroenterology.* 2007;132:1979-98.
16. Waheed Y, Shafi T, Safi SZ, Qadri I. **Hepatitis C virus in Pakistan: a systematic review of prevalence, genotypes and risk factors.** *World J Gastroenterol.* 2009;15:5647-53.
17. Halota W, Flisiak R, Boroń-Kaczmarek A, Juszczyk J., Cianciara, J., Pawłowska M., Simon K., Małkowski P. **Standardy leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C. Rekomendacje Polskiej Grupy Ekspertów HCV – 2011** 2011.
18. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, et al. **A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel.** *Liver Int.* 2011;31:30-60.
19. Lavanchy D. **Evolving epidemiology of hepatitis C virus.** *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:107-15.
20. Flisiak R, Halota W, Horban A, Juszczyk J, Pawłowska M, Simon K. **Prevalence and risk factors of HCV infection in Poland.** *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23:1213-7.
21. Hartleb M, Gutkowski K, Zejda JE, Chudek J, Więcek A. **Serological prevalence of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection in the elderly population: Polish nationwide survey--PolSenior.** *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012;24:1288-95.
22. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. **Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem.** *Hepatology.* 2008;47:321-31.
23. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, et al. **Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group.** *N Engl J Med.* 1994;330:744-50.

24. Chu CM, Yeh CT, Liaw YF. **Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus.** Gut. 1999;45:613-7.
25. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. **Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups.** Lancet. 1997;349:825-32.
26. Massard J, Ratziu V, Thabut D, et al. **Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C.** J Hepatol. 2006;44:19-24.
27. Dhingra K, Michels SD, Winton EF, Gordon DS. **Transient bone marrow aplasia associated with non-A, non-B hepatitis.** Am J Hematol. 1988;29:168-71.
28. Sheehan V, Weir A, Waters B. **Severe neutropenia in patients with chronic hepatitis C: a benign condition.** Acta Haematol. 2013;129:96-100.
29. Streiff MB, Mehta S, Thomas DL. **Peripheral blood count abnormalities among patients with hepatitis C in the United States.** Hepatology. 2002;35:947-52.
30. Spivak JL. **The blood in systemic disorders.** Lancet. 2000;355:1707-12.
31. Rajan SK, Espina BM, Liebman HA. **Hepatitis C virus-related thrombocytopenia: clinical and laboratory characteristics compared with chronic immune thrombocytopenic purpura.** Br J Haematol. 2005;129:818-24.
32. Ponzetto A, Pugliese A. **Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection.** Dig Liver Dis. 2008;40:707-8
33. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, et al. **The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients.** Hepatology. 2006;43:1303-10.
34. Chevaliez S, Pawlotsky JM. **Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease.** Int J Med Sci. 2006;3:35-40.
35. Migdalski P, Juszczak J, Świętek K, Czajka A. **Kinetics of early phase HCV antigenemia: predicting efficacy of antiviral therapy.** E&C Hepatology 2006;2:31-5.
36. Pawlotsky JM. **Use and interpretation of virological tests for hepatitis C.** Hepatology. 2002;36:65-73.
37. Nagamine T, Ohtuka T, Takehara K, Arai T, Takagi H, Mori M. **Thrombocytopenia associated with hepatitis C viral infection.** J Hepatol. 1996;24:135-40.
38. Wang CS, Yao WJ, Wang ST, Chang TT, Chou P. **Strong association of hepatitis C virus (HCV) infection and thrombocytopenia: implications from a survey of a community with hyperendemic HCV infection.** Clin Infect Dis. 2004;39:790-6.
39. Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, et al. **Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection.** N Engl J Med. 2014;370:211-21.
40. Poordad F, McCone J, Jr., Bacon BR, et al. **Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection.** N Engl J Med. 2011;364:1195-206.
41. Casey LC, Lee WM. **Hepatitis C virus therapy update 2013.** Curr Opin Gastroenterol. 2013;29:243-9.
42. Wiegand J, Buggisch P, Boecher W, et al. **Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: the HEP-NET acute-HCV-II study.** Hepatology. 2006;43:250-6.
43. Caruntu FA, Benea L. **Acute hepatitis C virus infection: Diagnosis, pathogenesis, treatment.** J Gastrointestin Liver Dis. 2006;15:249-56.
44. Służewski W, Kowala-Piaskowska A, Wysocki J, Figlerowicz M, et al. **Treatment of chronic hepatitis C in children with pegylated interferon  $\alpha$ 2a and ribavirin--a multi-center study.** Acta Pol Pharm. 2012;69:319-26.
45. Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, et al. **A sustained virologic response reduces risk of all-cause mortality in patients with hepatitis C.** Clin Gastroenterol Hepatol. 2011;9:509-16.
46. Arnaud C, Trepo C, Petit MA. **Predictors of the therapeutic response in hepatitis C. A 2013 update.** Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2013;38:12-7.
47. Domagalski K, Pawłowska M, Tretyn A, Halota W, et al. **Association of IL28B Polymorphisms With the Response to Peginterferon Plus Ribavirin Combined Therapy in Polish Patients Infected With HCV Genotype 1 and 4.** Hepat Mon. 2013;13:e13678.

48. Forns X, Garcia-Retortillo M, Serrano T, et al. **Antiviral therapy of patients with decompensated cirrhosis to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation.** *J Hepatol.* 2003;39:389-96.
49. Sochocka M, Błach-Olszewska Z. **[Mechanisms of innate immunity].** *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2005;59:250-8.
50. Mocchegiani E, Malavolta M. **NK and NKT cell functions in immunosenescence.** *Aging Cell.* 2004;3:177-84.
51. Fujita T, Matsushita M, Endo Y. **The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution.** *Immunol Rev.* 2004;198:185-202.
52. Kozłowska J, Jabłowska J, Wiercińska-Drapała A. **[Toll-like receptors in viral hepatitis].** *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2009;63:351-4.
53. Kronenberg M. **Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes.** *Annu Rev Immunol.* 2005;23:877-900.
54. Kopydłowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, et al. **Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo.** *J Immunol.* 1999;163:1537-44.
55. Kumar H, Kawai T, Akira S. **Pathogen recognition by the innate immune system.** *Int Rev Immunol.* 2011;30:16-34.
56. Banchereau J, Steinman RM. **Dendritic cells and the control of immunity.** *Nature.* 1998;392:245-52.
57. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, et al. **Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:16606-11.
58. Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, Miura M, Imai K, Mezaki Y. **Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future.** *Cell Biol Int.* 2010;34:1247-72.
59. Knolle PA, Gerken G. **Local control of the immune response in the liver.** *Immunol Rev.* 2000;174:21-34.
60. Mozer-Lisewska I, Sikora J, Kowala-Piaskowska A, Kaczmarek M, Dworacki G, Żeromski J. **The incidence and significance of pattern-recognition receptors in chronic viral hepatitis types B and C in man.** *Arch Immunol Ther Exp.* 2010;58:295-302.
61. Imran M, Waheed Y, Manzoor S, et al. **Interaction of Hepatitis C virus proteins with pattern recognition receptors.** *Virol J.* 2012;22:9:126.
62. Chung H, Watanabe T, Kudo M, Chiba T. **Correlation between hyporesponsiveness to Toll-like receptor ligands and liver dysfunction in patients with chronic hepatitis C virus infection.** *J Viral Hepat.* 2011;18:e561-7.
63. Vasselon T, Detmers PA. **Toll receptors: a central element in innate immune responses.** *Infect Immun.* 2002;70:1033-41.
64. Herzer K, Falk CS, Encke J, et al. **Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity.** *J Virol.* 2003;77:8299-309.
65. Medzhitov R, Janeway C, Jr. **Innate immune recognition: mechanisms and pathways.** *Immunol Rev.* 2000;173:89-97.
66. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. **Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists.** *Nat Med.* 2007;13:552-9.
67. Tay CH, Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM. **Control of infections by NK cells.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998;230:193-220.
68. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. **NK cell and DC interactions.** *Trends Immunol.* 2004;25:47-52.
69. Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Jr., Tutt M, Kumar V. **Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function.** *J Immunol.* 1986;137:2735-9.
70. Hsu KC, Dupont B. **Natural killer cell receptors: regulating innate immune responses to hematologic malignancy.** *Semin Hematol.* 2005;42:91-103.
71. Gonzaga R, Matzinger P, Perez-Diez A. **Resident peritoneal NK cells.** *J Immunol.* 2011;187:6235-42.
72. Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. **Human NK-cell receptors.** *Immunol Today.* 2000;21:420-2.

73. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. **Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines.** *Annu Rev Immunol.* 1999;17:189-220.
74. Osna NA. **Hepatitis C virus and ethanol alter antigen presentation in liver cells.** *World J Gastroenterol.* 2009;15:1201-8.
75. Norris S, Collins C, Doherty DG, et al. **Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes.** *J Hepatol.* 1998;28:84-90.
76. Tomasiewicz K, Modrzewska R. **[Intrahepatic and peripheral blood lymphocytes during hepatitis C].** *Przegl Epidemiol.* 2006;60:665-72.
77. Bonorino P, Ramzan M, Camous X, et al. **Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C.** *J Hepatol.* 2009;51:458-67.
78. Pernollet M, Jouvin-Marche E, Leroy V, Vigan I, Zarski JP, Marche PN. **Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulations in the liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions.** *Clin Exp Immunol.* 2002;130:518-25.
79. Valiante NM, D'Andrea A, Crotta S, et al. **Life, activation and death of intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C.** *Immunol Rev.* 2000;174:77-89.
80. Guidotti LG, Chisari FV. **Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response.** *Annu Rev Immunol.* 2001;19:65-91.
81. Harrison RJ, Ettorre A, Little AM, Khakoo SI. **Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection.** *Clin Exp Immunol.* 2010;161:306-14.
82. Marras F, Bozzano F, De Maria A. **Involvement of activating NK cell receptors and their modulation in pathogen immunity.** *J Biomed Biotechnol.* 2011;ID 152430.
83. Tomasiewicz K, Modrzewska R, Korobowicz E. **[Impact of pegylated interferon alpha and ribavirin therapy of chronic hepatitis C on peripheral blood and intrahepatic lymphocytes].** *Pol Merkur Lekarski.* 2009;26:19-23.
84. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. **The biology of human natural killer-cell subsets.** *Trends Immunol.* 2001;22:633-40.
85. Sung PS, Choi HB, Kim SY, et al. **Frequency of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) in Korean patients with chronic HCV infection.** *J Korean Med Sci.* 2011;26:1483-8.
86. Vilches C, Parham P. **KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.** *Annu Rev Immunol.* 2002;20:217-51.
87. Khakoo SI, Carrington M. **KIR and disease: a model system or system of models?** *Immunol Rev.* 2006;214:186-201.
88. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. **Hanging in the balance. KIR and their role in disease.** *Mol Interv.* 2005;5:226-40.
89. Vidal-Castineira JR, Lopez-Vazquez A, Diaz-Pena R, et al. **Effect of killer immunoglobulin-like receptors in the response to combined treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection.** *J Virol.* 2010;84:475-81.
90. Biassoni R, Cantoni C, Pende D, et al. **Human natural killer cell receptors and co-receptors.** *Immunol Rev.* 2001;181:203-14.
91. Ward J, Bonaparte M, Sacks J, et al. **HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts.** *Blood.* 2007;110:1207-14.
92. Krishnan VV, Khan IH, Luciw PA. **Multiplexed microbead immunoassays by flow cytometry for molecular profiling: Basic concepts and proteomics applications.** *Crit Rev Biotechnol.* 2009;29:29-43.
93. Imran M, Waheed Y, Manzoor S, et al. **Interaction of Hepatitis C virus proteins with pattern recognition receptors.** *Virology.* 2012;9:126-135.
94. Schuppan D, Afdhal NH. **Liver cirrhosis.** *Lancet.* 2008;371:838-51.
95. Eisenhardt M, Glassner A, Kramer B, et al. **The CXCR3(+)CD56Bright phenotype characterizes a distinct NK cell subset with anti-fibrotic potential that shows dys-regulated activity in hepatitis C.** *PLoS One.* 2012;7:e38846.
96. Golden-Mason L, Cox AL, Randall JA, Cheng L, Rosen HR. **Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro.** *Hepatology.* 2010;52:1581-9.



97. Żeromski J, Mozer-Lisewska I, Kaczmarek M, Kowala-Piaskowska A, Sikora J. **NK cells prevalence, subsets and function in viral hepatitis C.** Arch Immunol Ther Exp. 2011;59:449-55.
98. Amadei B, Urbani S, Cazaly A, et al. **Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus.** Gastroenterology. 2010;138:1536-45.
99. Corado J, Toro F, Rivera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB. **Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection.** Clin Exp Immunol. 1997;109:451-7.
100. Alter G, Jost S, Rihn S, et al. **Reduced frequencies of NKp30+NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance.** J Hepatol. 2011;55:278-88.
101. Yoon JC, Lim JB, Park JH, Lee JM. **Cell-to-cell contact with hepatitis C virus-infected cells reduces functional capacity of natural killer cells.** J Virol. 2011;85:12557-69.
102. Ahlenstiel G, Titerence RH, Koh C, et al. **Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner.** Gastroenterology. 2010;138:325-35 e1-2.
103. Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, et al. **Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation.** J Immunol. 2003;170:5615-24.
104. Ruggieri A, Harada T, Matsuura Y, Miyamura T. **Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein.** Virology. 1997;229:68-76.
105. Irshad M, Khushboo I, Singh S. **Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects.** Int Rev Immunol. 2008;27:497-517.
106. Heim MH. **Innate immunity and HCV.** J Hepatol. 2013;58:564-74.
107. Walewska-Zielecka B, Madaliński K, Jabłonska J, Godzik P, Cielecka-Kuszyk J, Litwińska B. **Composition of inflammatory infiltrate and its correlation with HBV/HCV antigen expression.** World J Gastroenterol. 2008;14:4040-6.
108. Mania A, Kaczmarek M, Kemnitz P, Mozer-Lisewska I, Sikora J, Figlerowicz M, Woźniak A, Mazur-Melewska K, Służewski W, Żeromski J. **Alterations in NK cell phenotype in relation to liver steatosis in children with chronic hepatitis C.** Inflammation. 2013;36:1004-12.
109. Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. **Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners.** Gastroenterology. 2006;130:435-52.
110. Muhanna N, Abu Tair L, Doron S, et al. **Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation.** Gut. 2011;60:90-8.
111. Morishima C, Paschal DM, Wang CC, et al. **Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing.** Hepatology. 2006;43:573-80.
112. Oliviero B, Mele D, Degasperi E, et al. **Natural killer cell dynamic profile is associated with treatment outcome in patients with chronic HCV infection.** J Hepatol. 2013;59(1):38-44.
113. Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, et al. **Sustained response to interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells.** Hepatol Res. 2008;38:664-72.
114. Golden-Mason L, Bambha KM, Cheng L, et al. **Natural killer inhibitory receptor expression associated with treatment failure and interleukin-28B genotype in patients with chronic hepatitis C.** Hepatology. 2011;54:1559-69.
115. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, et al. **Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection.** J Immunol. 2002;169:4279-87.
116. Nabi SG, Zaffar G, Sheikh NI, Hassan K, Hassan U. **Hepatitis C virus genotypes: A plausible association with viral loads.** Indian J Pathol Microbiol. 2013;56:384-7.
117. Tran A, Yang G, Doglio A, et al. **Phenotyping of intrahepatic and peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis C.** Dig Dis Sci. 1997;42:2495-500.
118. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. **The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications.** Immunol Res. 2008;40:18-34.
119. Xia M, Guerra N, Sukhova GK, et al. **Immune activation resulting from NKG2D/ligand interaction promotes atherosclerosis.** Circulation. 2011;124:2933-43.

120. Guerra N, Pestal K, Juarez T, et al. **A selective role of NKG2D in inflammatory and autoimmune diseases.** Clin Immunol. 2013;149(3):432-9.
121. Mozer-Lisewska I, Mania A, Kowala-Piaskowska A, Kluk A, Samara H, Pauli A, Żeromski J. **Detection and Significance of Cytotoxic Cell Subsets in Biopsies of HCV-Infected Human Livers.** Arch Immunol Ther Exp. 2014;62:153-60.
122. Holder KA, Stapleton SN, Gallant ME, Russell RS, Grant MD. **Hepatitis C virus-infected cells downregulate NKp30 and inhibit ex vivo NK cell functions.** J Immunol. 2013;191:3308-18.
123. Nattermann J, Feldmann G, Ahlenstiel G, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U. **Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C.** Gut. 2006;55:869-77.
124. De Maria A, Fogli M, Mazza S, et al. **Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients.** Eur J Immunol. 2007;37:445-55.
125. Sivori S, Vitale M, Morelli L, et al. **p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation.** J Exp Med. 1997;186:1129-36.
126. Winchester BG. **Lysosomal membrane proteins.** Eur J Paediatr Neurol. 2001;5:11-9.
127. Rehermann B, Naoumov NV. **Immunological techniques in viral hepatitis.** J Hepatol. 2007;46:508-20.
128. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. **Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity.** Cell Immunol. 2009;254:149-54.
129. Jouvin-Marche E, Macek Jilkova Z, Thelu MA, et al. **Lymphocytes Degranulation in Liver in Hepatitis C Virus Carriers Is Associated With IFNL4 Polymorphisms and ALT Levels.** J Infect Dis. 2014;209:1907-15.
130. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. **HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection.** Science. 2004;305:872-4.
131. Mian MO, Paradis P, Schiffrin EL. **Innate immunity in hypertension.** Curr Hypertens Rep. 2014;16:413.
132. Andrade F. **Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state.** Immunol Rev. 2010;235:128-46.
133. Pham CT, Ley TJ. **The role of granzyme B cluster proteases in cell-mediated cytotoxicity.** Semin Immunol. 1997;9:127-33.
134. Eguchi A, Wree A, Feldstein AE. **Biomarkers of liver cell death.** J Hepatol. 2014;60:1063-74
135. Gores GJ, Kaufmann SH. **Is TRAIL hepatotoxic?** Hepatology. 2001;34:3-6.
136. Zheng SJ, Wang P, Tsabary G, Chen YH. **Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation.** J Clin Invest. 2004;113:58-64.
137. Saitou Y, Shiraki K, Fuke H, et al. **Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors in viral hepatic diseases.** Hum Pathol. 2005;36:1066-73.

## 11. Spis rycin i tabel

Rycina 1. Budowa genomu wirusa HCV. Objasnienia skrótów w tekście oraz w wykazie skrótów. Na podstawie Lloyd A.R. <sup>9</sup> - modyfikacja własna. ....	10
Rycina 2. Model replikacji wirusa HCV. Modyfikacja własna na podstawie Pawlowsky, J.M. <sup>12</sup> .....	13
Rycina 3. Częstość zakażeń HCV na świecie na rok 2010 – modyfikacja własna na podstawie Lavanchy, D. <sup>19</sup> .....	15
Rycina 4. Etapy zakażenia HCV i procentowy rozkład progresji choroby.....	16
Rycina 5. Rozwój leczenia przewlekłego zakażenia HCV i jego skuteczność u pacjentów wcześniej nieleczonych (naiwnych). Na podstawie Mauss, S. <sup>14</sup> – modyfikacja własna.....	25
Rycina 6. Mechanizm działania komórek NK. A – mechanizm bezpośredni, B- pośredni. Opis w tekście. Na podstawie Golden-Mason, L. [4]- modyfikacja własna. Skrót: DC – komórki dendrytyczne, Th) – niedojrzałe komórki T pomocnicze, TRAIL – ligand indukujący apoptozę. ....	31
Rycina 7. Aktywacja i inhibicja komórek NK - uczestniczące w tym procesie receptory i ligandy. Na podstawie Golden-Mason, L. (4) – modyfikacja własna. ....	40
Rycina 8. Naciek zapalny w PZWB I C – na podstawie Walewska-Zielecka B. <sup>107</sup> - interpretacja własna. ....	42
Rycina 9. Rola komórek NK na poszczególnych etapach zakażenia HCV. Opracowanie własne według Golden-Mason, L. [4].....	45
Rycina 10. Rozkład częstości genotypów w grupie badanej (n=98).....	53
Rycina 11. Rozkład ładunku wirusowego HCV-RNA w grupie badanej.....	53
Rycina 12. Rozkład wartości prób wątrobowych i AFP w grupie badanej.....	54
Rycina 13. Rozkład wartości leukocytów (WBC), limfocytów (LYMPH) i komórek NK w grupie badanej i kontrolnej..	55
Rycina 14. Rozkład wyników zapalenia i włóknienia wątroby względem liczby chorych. ....	56
Rycina 15. Przykładowy rozkład cytometryczny limfocytów i monocytów krwi obwodowej u osoby należącej do grupy zakażonych HCV+. 1. Chory o inicjalach K.H., lat 54 A) wybramkowana subpopulacja komórek jednojądrzastych; B) Komórki NK i NKT, C) Komórki CD107a+ (Q1), D) MFI kom. CD107a+ (P2). 2. Chory C.S, lat 36 – opis jak u chorego K.H.....	57
Rycina 16. Przykładowy rozkład cytometryczny limfocytów i monocytów krwi obwodowej u osoby należącej do grupy kontrolnej. 1. Kontrola P.B., A) wybramkowana subpopulacja komórek jednojądrzastych; B) Komórki NK i NKT, C) Komórki CD107a+ (Q1), D) MFI kom. CD107a+ (P2). 2. Kontrola W.W. – opis jak u kontroli P.B. ....	58
Rycina 17. Porównanie średnich wartości odsetka komórek NK z obecnym antygenem w grupie zakażonych HCV vs. kontrola. * - $p < 0,05$ .....	64
Rycina 18. Porównanie średnich wartości odsetka komórek NK z nieobecnym antygenem w grupie zakażonych HCV vs. kontrola. * - $p < 0,05$ .....	64
Rycina 19. Porównanie średnich wartości MFI poszczególnych antygenów w grupie zakażonych HCV vs. kontrola. * - $p < 0,05$ .....	65
Rycina 20. Korelacja MFI granzym B względem wieku chorych. ....	67
Rycina 21. Wykres MFI granzymu B w grupach $\leq i > GGN AST (A)$ oraz MFI CD 107a w grupach $\leq i > GGN ALT (B)$ u osób zakażonych.....	69
Rycina 22. Wykres korelacji rang Spearmana dla MFI CD314 względem stopnia zapalenia i włóknienia wątroby u zakażonych HCV. ....	73
Rycina 23. Zależność między wynikami MFI CD314+ dla osób z chorobą współistniejącą a wynikami pacjentów bez choroby współistniejącej. ....	75
Rycina 24. Zależność między wynikami MFI CD337+ dla osób z chorobą towarzyszącą a wynikami pacjentów bez choroby towarzyszącej. ....	76
Rycina 25. Rozkład średnich wartości MFI CD107a w grupie, gdzie nie stwierdza się chorób współistniejących oraz w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym (NT). ....	77
Rycina 26. Wyniki dotyczące odsetka komórek NK CD 337+ (A) oraz MFI CD 337 (B) w grupach badanych. ....	78
Rycina 27. Porównanie średnich wyników dla odsetka komórek NK CD 337- w zależności od okresu ekspozycji.....	79
Rycina 28. Ekspresja TRAIL w zależności o oceny patomorfologicznej.....	79

<i>Tabela 1. Rozmieszczenie geograficzne poszczególnych genotypów i subtypów na podstawie Nakano, T. [5] – modyfikacja własna. ....</i>	<i>9</i>
<i>Tabela 2. Ryzyko powikłań u chorych z dodatnim HCV-RNA z wyrównaną marskością wątroby w zależności od istnienia lub braku dodatkowych obciążeń wątroby (kofaktorów). Na podstawie Massard, J [26] - modyfikacja własna. ....</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 3. Oznaczenia używane w ocenie odpowiedzi wirusologicznej na leczenie. ....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 4. Receptory komórek NK. ....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 5. Interakcje białek wirusa HCV z receptorami rozpoznającymi wzorce PRR. Na podstawie Imran, M. (61) – modyfikacja własna. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 6. Wartości referencyjne wykonanych badań laboratoryjnych. ....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 7. Znakowane przeciwciała wykorzystane w pracy. ....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 8. Skala określająca siłę związku korelowanych danych o istotności statystycznej. ....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 9. Wiek chorych i znany okres zakażenia HCV z podziałem na płeć. ....</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 10. Badania biochemiczne i AFP w grupie zakażonych (n=98). Podano ile osób prezentowało wynik powyżej górnej granicy normy (GGN) i powyżej wielokrotności GGN (nxGGN). ....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 11. Rozkład wartości dotyczących leukocytów, limfocytów oraz komórek NK w grupie badanej. ....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 12. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD107a w grupie badanej. ....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 13. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD158b w grupie badanej. ....</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 14. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD158i w grupie badanej. ....</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 15. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD314 w grupie badanej. ....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 16. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD335 w grupie badanej. ....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 17. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD336 w grupie badanej. ....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 18. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD337 w grupie badanej. ....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 19. Rozkład średnich wartości odsetkowych CD253 w grupie badanej. ....</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 20. Rozkład średnich wartości odsetkowych granzym B w grupie badanej. ....</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 21. Korelacje wieku pacjentów z wynikami cytometrii. ....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 22. Korelacje wyników biochemii i AFP z wynikami cytometrii. W Tabeli przedstawiono wartość współczynnika korelacji r dla badanych parametrów. ....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 23. Zestawienie wyników korelacji w grupie HCV z wiremią &gt;10<sup>5</sup> oraz wyników korelacji w całej grupie HCV dodatniej. ....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 24. Porównanie wyników cytometrycznych w grupie HCV+ w zależności od wiremii. ....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 25. Korelacja stopnia zapalenia, stopnia włóknienia oraz odsetka stłuszczenia wątroby u chorych. ....</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 26. Jednostki chorobowe występujące w grupie zakażonych HCV. ....</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 27. Porównanie wyników cytometrycznych dla antygeny CD 314 u osób zakażonych HCV z chorobami współistniejącymi względem zakażonych bez chorób dodatkowych. ....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 28. Porównanie wyników cytometrycznych dla antygeny CD 337 u osób zakażonych HCV z dodatkowymi chorobami towarzyszącymi względem zakażonych bez chorób towarzyszących. ....</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 29. Porównanie wyników dotyczących odsetka komórek NK CD 337+ w zależności od czasu ekspozycji na zakażenie. ....</i>	<i>78</i>