

**mgr Sylwia Osuch**

**Analiza zależności pomiędzy wyczerpaniem komórek T,  
zmiennością genetyczną epitopów wirusa zapalenia wątroby typu  
C (HCV) rozpoznawanych przez komórki T, a leczeniem  
przeciwwirusowym względem HCV**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

**STRESZCZENIA**

Promotor: dr hab. n. med. i n. o zdr. Kamila Caraballo Cortés

Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych Warszawskiego  
Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa, 2022 r.

## Streszczenie

W przewlekłym zapaleniu wątroby typu C (pwzw C), wywoływanym przez zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) dochodzi do „wyczerpania” funkcji komórek T, co skutkuje spadkiem uwalniania cytokin efektorowych, upośledzoną eliminacją zakażonych komórek i zmniejszonym potencjałem proliferacyjnym. Zjawisko to jest zależne od ciągłej stymulacji antygenowej, rozwija się wraz z czasem trwania zakażenia i towarzyszy mu ekspresja receptorów „hamujących”, m. in.: PD-1 (białka programowanej śmierci komórki 1), jak i Tim-3 (transbłonowej immunoglobuliny i mucyny 3 limfocyty T) na całkowitych i swoistych dla HCV komórkach T. Receptory te hamują aktywację tych komórek po rozpoznaniu antygeny. Dodatkowo, dochodzi do zwiększenia wydzielania cytokin przeciwzapalnych, np. IL-10.

Jak dotychczas, badania nad „wyczerpaniem” komórek T w pwzw C koncentrowały się na opisie tego zjawiska, natomiast nie zostało wyjaśnione, czy „wyczerpanie” komórek T jest uzależnione od wariantu antygenowego HCV. Nie jest również pewne, czy leczenie pwzw C wpływa na to zjawisko.

Celami pracy doktorskiej były:

- 1) określenie zależności pomiędzy zmiennością epitopów HCV rozpoznawanych przez komórki T CD8<sup>+</sup>, a „wyczerpaniem” odpowiedzi immunologicznej tych komórek w pwzw C,
- 2) określenie wpływu skutecznego leczenia pwzw C z udziałem DAA na stopień „wyczerpania” odpowiedzi komórek T krwi obwodowej.

Materiałem do badań była krew 97 pacjentów z pwzw C, zakwalifikowanych do terapii lekami o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym. Próbkę pobierano przed rozpoczęciem terapii jak i sześć miesięcy po jej zakończeniu. Materiałem kontrolnym była krew 18 osób zdrowych (anty-HCV). Markery „wyczerpania” (poziom ekspresji PD-1 oraz Tim-3 na całkowitych oraz HCV-swoistych komórkach T) określono za pomocą wieloparametrycznej cytometrii przepływowej, a stężenie IL-10 w osoczu za pomocą metody ELISA. Zmienność genetyczną epitopów HCV rozpoznawanych przez komórki T oszacowano za pomocą sekwencjonowania następnej generacji (Illumina).

## Realizacja celu 1

Wyniki analizy wykazały zależność pomiędzy sekwencjami analizowanych epitopów a fenotypem „wyczerpania” limfocytów T CD8<sup>+</sup>. Zakażenie wariantem o sekwencji epitopu NS3<sub>1406</sub> nie reprezentującym prototypu charakterystycznego dla HCV 1b (KLSGLGLNAV), ani też wariantu reaktywnego krzyżowo (KLSSLGLNAV, KLSGLGINAV lub KLSALGLNAV) było związane z wyższym odsetkiem limfocytów T CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> swoistych dla HCV. Zmienność (co najmniej dwa warianty) sekwencji epitopu NS3<sub>1406</sub> była związana ze zwiększonym odsetkiem obwodowych komórek T o fenotypie CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> i niższym odsetkiem komórek T CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>Tim-3<sup>-</sup>. Zakażenie dominującym wariantem epitopu NS3<sub>1073</sub> innym niż prototyp dla HCV 1b (CVNGVCWTV) było związane z niższym odsetkiem obwodowych limfocytów T CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>. Wyniki te wskazują, że istnieje zależność pomiędzy odsetkiem komórek T z ekspresją receptorów PD-1/Tim-3 a sekwencją epitopów HCV rozpoznawanych przez komórki T oraz ich zmiennością oraz sugerują, że analiza zjawiska „wyczerpania” komórek T wymaga oceny kontekstu sekwencji epitopów wirusa.

## Realizacja celu 2

Przed leczeniem, odsetki obwodowych komórek o fenotypie CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> oraz poziom IL-10 w osoczu były istotnie statystycznie wyższe, a odsetki komórek CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>Tim-3<sup>-</sup> oraz CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>Tim-3<sup>-</sup> niższe w grupie pacjentów, niż w grupie kontrolnej. Leczenie spowodowało znamienne zmniejszenie odsetków komórek T CD4<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> oraz poziomu IL-10 w osoczu oraz równoczesny wzrost odsetków komórek T fenotypu CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>Tim-3<sup>-</sup> oraz CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>Tim-3<sup>-</sup>. Nie było istotnych zmian w odsetku występowania komórek T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>, podczas gdy odsetek komórek T CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> znamienne wzrósł.

Ważnym dodatkowym odkryciem było wykazanie, że pacjentów z zaawansowanym zwłóknieniem wątroby charakteryzował wyższy poziom ekspresji PD-1 i niższy poziom ekspresji Tim-3 na komórkach T CD4<sup>+</sup>, a leczenie miało niewielki lub żaden wpływ na ekspresję markerów „wyczerpania” u tych pacjentów.

Częstość występowania obwodowych komórek T CD8<sup>+</sup> swoistych dla HCV uległa znamiennej obniżeniu po leczeniu, ale poziom ekspresji PD-1 i Tim-3 na tych komórkach pozostał bez zmian.

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że skuteczne leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C jest związane ze zmniejszeniem poziomu IL-10 w osoczu oraz redukcją poziomu ekspresji markerów „wyczerpania” immunologicznego komórek T, ale efekt ten nie występuje u pacjentów z zaawansowanym zwłóknieniem wątroby. Sugeruje to, że długotrwałe zakażenie przewlekłe HCV powoduje nieodwracalne zmiany fenotypu tych komórek.