

# Инфекционные болезни, ИММУНОЛОГИЯ, ИММУНОТЕРАПИЯ



УДК 616.36-002.2-085.37

Д. А. Сахарова, Ю. А. Витковский, П. П. Терешков

## КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

*Читинская государственная медицинская академия, 672090, ул. Горького, 39а,  
тел. 8-(3022)-35-43-24, факс 8-(3022)-32-30-58, e-mail: pochta@medacadem.chita.ru, г. Чита*

### Резюме

В статье представлен анализ изменений клеточного иммунитета у больных хроническим вирусным гепатитом С. Всего было обследовано 69 человек в возрасте от 16 до 58 лет. В ходе исследования установлено, что у всех больных хроническим вирусным гепатитом С изменены показатели иммунограммы по сравнению с нормой: выявлен выраженный рост популяции активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR+) при значительном снижении популяций активированных Т-хелперов (CD3+CD4+HLA-DR+), активированных Т-киллеров (CD3+CD8+HLA-DR+), NK-клеток (CD3-CD16+CD56+) и Т-NK-клеток (CD3+CD16+CD56+), что является проявлением дисрегуляции клеточного иммунитета. При этом, установлено снижение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии в 73,8 % случаев, что свидетельствует о дисфункции Т-лимфоцитов, проявляющейся в уменьшении их способности к адгезии тромбоцитов.

*Ключевые слова:* хронический гепатит С, иммунитет, иммунограмма, Т-лимфоциты, лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия.

D. A. Sakharova, Yu. A. Vitkovskiy, P. P. Tereshkov

## CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

*Chita State Medical Academy, Chita*

### Summary

The analysis of changes of cellular immunity in patients with chronic viral hepatitis C is studied. 69 people at the age from 16 to 58 years were examined. The study demonstrated that all patients with chronic viral hepatitis C had changed immunological indicators, compared to the norm: a pronounced growth in the population of activated T-lymphocytes (CD3+HLA-DR+) with a significant reduction in populations of activated T-helper lymphocytes (CD3+CD4+HLA-DR+), activated T cells (CD3+CD8+HLA-DR+), NK-cells (CD3-CD16+CD56+) and T-NK-cells (CD3+, CD16+CD56+) manifesting deregulation of cellular immunity. Adhesion of lymphocytes with platelets decreased in 73, 8 % of cases. This indicates the dysfunction of T-lymphocytes, which is manifested in the decrease of platelet adhesion.

*Key words:* chronic viral hepatitis C, immunity, immunogram, T-lymphocytes, adhesion of lymphocytes with platelets.

Мировая пандемия вирусного гепатита С является одной из самых актуальных проблем современной медицины, что обусловлено не только его широкой распространенностью, но и латентностью течения, высокой частотой хронизации, выраженностью неблагоприятных исходов – цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, которые являются ведущими в структуре смертности от заболеваний печени.

К сожалению, в мире еще не создана вакцина против гепатита С и ВОЗ прогнозирует, что к 2015 году показатель заболеваемости вирусным гепатитом С может утроиться [9]. Россия не является исключением. Еще на VIII Всероссийском съезде эпидемиологов Главный санитарный врач РФ Г.Г. Онищенко (2002) особо отметил неуклонный рост заболеваемости гепатитом С в стране. Предполагается, что к 2015-2020 гг.

увеличится частота выявления хронического гепатита С на стадии цирроза печени и возрастет количество HCV-ассоциированной гепатокарциномы [6].

В настоящее время считается установленным, что высокая частота (50-85 % по данным различных авторов) формирования хронических форм и развития осложнений обусловлена «ускользанием» вируса от иммунного надзора [5, 7]. Механизмы этого феномена до сих пор четко не установлены. Предполагается, что центральную роль в элиминации вируса гепатита С играет Т-клеточное звено иммунитета [1, 8]. Существенное значение в поддержании патологического процесса у больных придается недостаточности CD4+Т-хелперов и дисбалансу цитокинов [9].

Таким образом, основную роль в формировании характера иммунного реагирования макроорганизма играет взаимодействие в системе «вирус-хозяин», что определяет сценарий развития событий при HCV-инфекции [4]. В тоже время многие аспекты иммунного ответа при гепатите С остаются невыясненными, хотя это актуально как в теоретическом аспекте для понимания иммунопатогенеза, так и в практическом плане для прогноза течения болезни.

*Целью настоящей работы* стало изучение иммунного статуса больных хроническим вирусным гепатитом С.

#### Материалы и методы

Было обследовано 69 человек, находившихся на стационарном лечении в ГУЗ «Краевая клиническая инфекционная больница» г. Читы за период с 2011 по 2013 гг. по поводу хронического вирусного гепатита С. Женщин было 30,4 % (21), мужчин – 69,6 % (48). Обследованные находились в возрасте от 16 до 58 лет, средний возраст –  $36 \pm 1$  лет. От всех пациентов получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Диагноз хронического вирусного гепатита С выставлен на основании клинико-лабораторных данных и обнаружения РНК HCV методом ПЦР. Длительность заболевания до 5 лет выявлена у 66,7 %, свыше 5 лет – у 33,3 %. Первая степень биохимической активности процесса определялась у 55,0 % больных ХВГС, вторая – у 45,0 %. Стадия заболевания по Metavir F 0-F 1 была диагностирована у 43,5 %; F 2 – у 42,0 %; F 3-F 4 – у 14,5 %.

Кровь для иммунологического обследования получали путем пункции локтевой вены в строго стерильных условиях на 2-3-и сутки стационарного лечения. Взятие крови осуществляли в утренние часы (8-9 часов) строго натощак. Для иммунофенотипирования кровь забирали в пробирку VACUTAINER (BD), содержащую динатриевую соль ЭДТА объемом 2,5 мл.

Изучались активность и количество Lymphocytes (CD45+), T-cell (CD3+), T-help (CD3+CD4+), T-killer (CD3+CD8+), T-cellAktiv (CD3+HLA-DR+), T-helpAktiv (CD3+CD4+HLA-DR+), T-killAktiv (CD3+CD8+HLA-DR+), B-cell (CD19+), NK-cell (CD3-CD16+CD56+), T-NK-cell (CD3+CD16+CD56+).

Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли стандартным методом прямого пятипараметрического иммунофлюоресцентного окрашива-

ния цельной крови с использованием коммерческого лизирующего/фиксирующего раствора OPTILYSE С (Beckman Coulter) и панели моноклональных антител tetraCHROME™ и IOTest (Beckman Coulter): 1-я панель – CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и HLA-DR-PC7; 2-я панель – CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 и CD16-PC7. Контрольные пробы инкубировали с иммуноглобулинами, мечеными флуорохромами (FITC, RD1, ECD, PC5, PC7) соответствующего изотипа – мышиные IgG1, IgG2a IOTest (Beckman Coulter). Цитофлюориметрию осуществляли на проточном цитофлюориметре «Cytomics FC-500» (Beckman Coulter, USA), регистрировали суммарно не менее 10 тысяч событий. Данные анализировали с помощью программы CXP Cytometer (Beckman Coulter).

Определение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) проводили по методу, предложенному Ю. А. Витковским и соавт. (1999) [2]. Свежую гепаринизированную кровь обследуемых больных наслаивали на градиент урографин-фикол (плотность – 1,077) и выделяли лимфоциты. Собирали интерфазное кольцо, содержащие клетки и кровяные пластинки, однократно промывали фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) и центрифугировали при 1 000 об./мин. в течение 3-4 минут. Надосадочную жидкость сливали, осадок микроскопировали в камере Горяева. Показатель ЛТА выражали числом лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов на 100 клеток (норма – 13-15 %). Степень адгезии (ЛТИ) определяли как число кровяных пластинок, адгезированных на поверхности одного лимфоцита (норма –  $3,0 \pm 0,3$ ).

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета анализа Microsoft Excel. Она включала описание выборки, нахождение средней арифметической, среднеквадратического отклонения и ошибки средней арифметической, определялись частоты встречаемости признаков, группировка данных.

#### Результаты и обсуждение

Установлено, что у всех больных хроническим вирусным гепатитом С изменены показатели иммунограммы, по сравнению с нормой. Средние значения показателей иммунограммы представлены в таблице 1; отклонения от нормы – в таблице 2.

Так, у 44,9 % обследованных относительное количество лимфоцитов оказалось сниженным ( $21,8 \pm 0,8$  %), при этом, абсолютное число лимфоцитов было снижено только у 8,7 %. Процент субпопуляции лимфоцитов CD3+CD4+ был повышен у 23,2 % пациентов (59 – 30,8 %), субпопуляции CD3+CD8+ – у 17,4 %.

В 50,7 % случаев обнаружены изменения в клеточном звене иммунитета: у 31,9 % больных выявлено снижение ( $1,13 \pm 0,05$ ) иммунорегуляторного индекса (CD4+/CD8+), у 18,8 % больных иммунорегуляторный индекс был повышен ( $3,22 \pm 0,22$ ).

Популяция активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR+) была существенно увеличена у 53,9 % обследованных ( $14,43 \pm 2,10$  %;  $302,43 \pm 40,81$ ). В 89,9 % случаев установлено снижение активированных Т-хелперов (CD3+CD4+HLA-DR+) –  $1,94 \pm 0,11$  %. Одновременно с этим у 69,6 % пациентов была

снижена субпопуляция активированных Т-киллеров (CD3+CD8+HLA-DR+) – 2,03± 0,15 %. Выявлено значительное снижение относительного и абсолютного количества популяции CD3-CD16+CD56+ у 82,6 % больных: 2,26±0,27 % и 45,70±5,88 соответственно.

Таблица 1

Средние значения показателей иммунного статуса у больных ХВГС

Показатели	Норма	Больные ХВГС, n=70
Lymphocytes (CD45+), %	28-36	27,65 ± 0,75
Lymphocytes (CD45+), Н	1363-2808	2253,47 ± 84,95
T-cell (CD3+), %	61-85	80,05 ± 0,80
T-cell (CD3+), Н	946-2079	1796,86 ± 69,04
T-help (CD3+CD4+), %	35-55	48,74 ± 1,03
T-help (CD3+CD4+), Н	576-1336	1103,03 ± 48,93
T-killer (CD3+CD8+), %	19-35	27,59 ± 0,91
T-killer (CD3+CD8+), Н	372-974	614,84 ± 30,66
CD4+/CD8+	1,5-2,6	1,96 ± 0,10
T-cellAktiv (CD3+HLA-DR+), %	0,5-6,0	9,22 ± 1,21
T-cellAktiv (CD3+HLA-DR+), Н	7-165	199,81 ± 24,34
T-helpAktiv (CD3+CD4+HLA-DR+), %	4-12	2,45 ± 0,26
T-killerAktiv (CD3+CD8+HLA-DR+), %	5-18	4,62 ± 0,69
B-cell (CD19+), %	7-17	10,25 ± 0,61
B-cell (CD19+), Н	111-376	232,87 ± 18,61
NK-cell (CD3-CD16+CD56+), %	8-17	3,77 ± 0,46
NK-cell (CD3-CD16+CD56+), Н	123-369	79,72 ± 9,70
T-NK-cell (CD3+CD16+CD56+), %	0,5-6,0	1,50 ± 0,30
T-NK-cell (CD3+CD16+CD56+), Н	7-165	27,55 ± 5,99

Таблица 2

Отклонения от нормы показателей иммунного статуса у больных ХВГС

Показатели	Распределение, в %		
	ниже нормы	норма	выше нормы
Lymphocytes (CD45+), %	44,9	47,8	7,3
Lymphocytes (CD45+), Н	8,7	69,6	21,7
T-cell (CD3+), %	1,5	76,8	21,7
T-cell (CD3+), Н	2,9	69,6	27,5
T-help (CD3+CD4+), %	5,8	71,0	23,2
T-help (CD3+CD4+), Н	5,8	69,6	24,6
T-killer (CD3+CD8+), %	10,2	72,4	17,4
T-killer (CD3+CD8+), Н	13,0	81,2	5,8
CD4+/CD8+	31,9	49,3	18,8
T-cellAktiv (CD3+HLA-DR+), %	0	46,1	53,9
T-cellAktiv (CD3+HLA-DR+), Н	0	63,8	36,2
T-helpAktiv (CD3+CD4+HLA-DR+), %	89,9	8,6	1,5
T-killerAktiv (CD3+CD8+HLA-DR+), %	69,6	20,6	4,4
B-cell (CD19+), %	30,4	53,7	15,9
B-cell (CD19+), Н	29,0	53,6	17,4
NK-cell (CD3-CD16+CD56+), %	82,6	17,4	0
NK-cell (CD3-CD16+CD56+), Н	73,9	26,1	0
T-NK-cell (CD3+CD16+CD56+), %	50,7	44,9	4,4
T-NK-cell (CD3+CD16+CD56+), Н	43,5	52,1	4,4

#### Литература

1. Баранов А. В. Эпидемиологические факторы и клинико-иммунологические аспекты патогенеза хронического гепатита С: автореферат ... дис. д-ра мед. наук. – М., 2009. – 47 с.
2. Витковский Ю. А., Кузник Б. И., Солпов А. В. Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарного розеткообразования // Иммунология. – 1999, № 4. – С. 35-37.
3. Гергесова Е. Е., Витковский Ю. А., Солпов А. В. Агрегация тромбоцитов, лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия и группы крови АВ0 у больных гриппом А(Н1N1)/2009 // ЭНИ Забайкальский медицинский вестник. – 2011, № 1. – С. 4-9.

Субпопуляция CD19+ была сниженной в 30,4 % случаев (4,8±0,3 %), повышенной – в 15,9 % случаев (19,13 ±0,63). Процент CD3+CD16+CD56+ был снижен у 50,7 % больных (0,17 ±0,03 %), у 21,7 % был повышен процент CD3+ (88,89±0,86 %).

В настоящее время широко изучаются межклеточные взаимодействия, особенно между системой гемостаза и иммунитета. Установлено, что тромбоциты имеют отношение к протеканию воспалительных реакций: адгезивные взаимодействия между тромбоцитами и лейкоцитами являются важными звеньями механизмов, обеспечивающих миграцию лейкоцитов в зону повреждения, а, следовательно, воспаления и развития иммунных и репаративных реакций [2, 3]. Этот феномен получил название лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии.

Установлено, что у больных хроническим вирусным гепатитом С общий показатель ЛТА является пониженным – 9,130 (56 %). Одновременно с этим уменьшенным было и среднее число тромбоцитов, вступивших в контакт с лимфоцитами – 2,60± 0,12.

Т.е. показатель лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии был ниже нормы у 73,8 % обследованных пациентов (7,300 – 45 %), выше – у 11,5 %; показатель ЛТИ оказался ниже нормы в 47,5 % случаев (1,82±0,11), выше – в 27,1 %.

#### Выводы

Таким образом, противовирусный потенциал у больных хроническим вирусным гепатитом С обеспечивается выраженным ростом популяции активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR+) при значительном снижении популяций активированных Т-хелперов (CD3+CD4+HLA-DR+), активированных Т-киллеров (CD3+CD8+HLA-DR+), NK-клеток (CD3-CD16+CD56+) и T-NK-клеток (CD3+CD16+CD56+), что является проявлением дисрегуляции клеточно-иммунитета и отражает иммунопатогенез HCV-инфекции.

При этом установлено снижение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных ХВГС в 73,8 % случаев, что свидетельствует о дисфункции Т-лимфоцитов, проявляющейся в уменьшении их способности к адгезии тромбоцитов.

Вышеизложенное позволяет рекомендовать определение иммунограммы и использование теста лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии для оценки иммунитета у больных вирусным гепатитом С.

4. Марченко Л. И. и др. Оценка иммунологической реактивности больных хроническим вирусным гепатитом С // Материалы VI Российского съезда врачей-инфекционистов. – СПб., 2003. – С. 381.

5. Мухин Н. А. «Трудный» больной в гепатологии // Гепатологический форум (приложение к журналу «Клиническая фармакология и терапия»). – 2005, № 1. – С. 6-8.

6. Онищенко Г. Г. Ситуация и меры борьбы с вирусными гепатитами в Российской Федерации // Медицинская кафедра. – 2002, № 2. – С. 18-22.

7. Орлова И. И., Зайнудинов З. М., Каганов Б. С. Хронический гепатит С // Вопросы современной педиатрии. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 37-47.

8. Семенов Т. А. Клеточный иммунный ответ при гепатите С // Вирусные гепатиты. – 2000, № 1. – С. 11-17.

9. Скляр Л. Ф. Система цитокинов и показатели оксидативного стресса при хроническом гепатите С с учетом иммунокорректирующей терапии: дис. ... канд. мед. наук. – Владивосток, 2006. – 270 с.

**Координаты для связи с авторами:** Сахарова Дарья Александровна – аспирант кафедры нормальной физиологии, ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ЧГМА, тел. +7-914-504-64-44, e-mail: d.sakharova@yandex.ru; Витковский Юрий Антонович – д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой нормальной физиологии ЧГМА, тел. +7-914-468-77-66, e-mail: yuvitkovsky@rambler.ru; Терешков Павел Петрович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией ЧГМА, тел. +7-924-271-6915, e-mail: tpp6915@mail.ru.

