

# ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТАДИЙ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С И ОЦЕНКА ФАКТОРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В.Ю. Никитин, И.А. Сухина, В.Н. Цыган, Д.А. Гусев

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

**The immunologic characteristic of the stages of chronic hepatitis C and an assessment of immune system factors as prognostic criteria of a current disease**

V.Yu. Nikitin, I.A. Sukhina, V.N. Tsigan, D.A. Gusev

Military Medical Academy by S.M. Kirov, Saint-Petersburg

**Резюме.** В настоящей работе представлены данные исследования факторов иммунной системы в периферической крови (ПК) больных хроническим гепатитом С (ХГС) с различной степенью выраженности фиброза: слабый фиброз Ф1 (n=32), умеренный фиброз Ф2 (n=22), тяжелый фиброз Ф3 (n=19) и цирроз печени Ф4 (n=13). Были изучены субпопуляции Т-лимфоцитов: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, субпопуляции В-клеток (CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>), иммуноглобулины А, М, G, высоко-, средне-, низкомолекулярные циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), цитокины Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4, IL-10) типа, провоспалительные цитокины TNF-α, IL-1-β. Исследования показали, что в ПК больных ХГС с увеличением степени фиброза повышается количество Т-киллеров (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>), общее число Т-клеток, экспрессирующих маркер активации HLA-DR (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), и отмечается тенденция к возрастанию числа активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>). С увеличением степени фиброза у пациентов с ХГС возрастали уровни IgG, IgA, TNF-α, IL-10, IFN-γ, средне-, низкомолекулярных ЦИК и уменьшалось количество активированных В-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). Данные исследования позволяют сделать вывод о доминировании гуморального иммунного ответа на всех стадиях ХГС, нарушении функций В-клеток и Th1/Th2 дисбалансе. Установленные изменения факторов иммунной системы могут быть использованы в качестве прогностических критериев течения ХГС.

**Ключевые слова:** факторы иммунной системы, хронический гепатит С, фиброз, цирроз.

## Введение

Вирусный гепатит С занимает лидирующее место среди гепатотропных инфекций в развитых странах, где инфицировано 1–2% населения [13]. Характерной особенностью этого заболевания является высокая частота хронизации инфекции (>85%), развития цирроза печени (20–30%) и гепа-

**Abstract.** In the present study factors of immune system in peripheral blood (PB) of patients with chronic hepatitis C (CHC) with the different degree of fibrosis were determined: weak fibrosis F1 (n=32), moderate fibrosis F2 (n=22), heavy fibrosis F3 (n=19) and cirrhosis of liver F4 (n=13). The following subpopulations of T-lymphocytes have been investigated: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>. Besides, the subpopulations of B-cells (CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>), Ig A, IgM, IgG, highly-, medial-, low-molecular circulating immune complexes (CIC), cytokines Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4, IL-10) types, as well as proinflammatory cytokines TNF-α, IL-1β were defined. This research showed that the patient with the high degree of fibrosis have the increased quantity NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>) and total count of activated T-cells HLA-DR (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) and the tendency for growing percentages of activated cytotoxic T-cells (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>). With the increase of the fibrosis degree in patient with CHC, levels of IgA, IgG, medium-, low-molecular CIC, cytokines IFN-γ, IL-10 were increasing and the quantity of activated B-cells (CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) were decreasing. The research shows the domination of the B-cells response while the function of B-lymphocytes are injured and also are observed Th1/Th2 disbalance at all stages of disease. The established changes of the factors of the immune system can be used as the prognostic criteria of CHC.

**Key words:** factors of immune system, chronic hepatitis C, fibrosis, cirrhosis.

токарциномы (4–8%) [24]. Различное течение и исходы гепатита С обусловлены гетерогенностью иммунного ответа, определенного как иммуногенетическим своеобразием организма-хозяина, так и биологическими особенностями HCV [15].

Наличие хронического инфекционного процесса, безусловно, является следствием недостаточности

противовирусного иммунитета. Как продемонстрировали многочисленные исследования, главную роль в элиминации HCV играет Т-клеточный ответ, так как действие нейтрализующих антител зачастую оказывается неэффективным. Спонтанное прекращение острой HCV-инфекции ассоциируется с сильным продолжительным мультиспецифическим CD4<sup>+</sup>-Т-клеточным пролиферативным и IFN- $\gamma$ -ответом, направленным одновременно на множество вирусных эпитопов-мишеней [17, 19]. При хроническом течении болезни наблюдается утрата способности CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток к пролиферации и к секреции IFN- $\gamma$ . Этот факт может объяснять частую клиническую асимптоматичность острой HCV-инфекции и слабую степень повреждения печени у большинства пациентов [21, 32].

Предполагается, что и острое, и хроническое повреждение печени при гепатите С происходит, в основном, за счет реализации иммунного ответа на HCV, а не его цитопатического действия. Клеточный иммунный ответ играет ключевую роль не только в элиминации вируса, но и в патологии печени при хронической HCV-инфекции [17]. С прогрессией ХГС связано повышение содержания некоторых цитокинов [3, 5, 6, 7, 9]. Появились публикации о связи В-клеточного фенотипа со степенью фиброза у пациентов с хронической HCV-инфекцией [25, 26, 29].

Поэтому изучение изменений факторов клеточного и гуморального звеньев иммунной системы на различных стадиях хронического гепатита С (ХГС) позволит оценить иммунологические факторы в качестве прогностических критериев течения этого заболевания. Разработка таких критериев поможет клиницисту прогнозировать развитие ХГС и выбрать рациональную лечебную тактику у конкретного больного.

### Цель исследования

Дать характеристику состояния иммунной системы больных ХГС при различных степенях фиброза печени и разработать прогностические критерии развития заболевания.

### Материалы и методы

Обследовано 86 человек с хронической HCV-инфекцией. Диагноз ХГС был установлен с помощью клинических, лабораторных и морфологических методов. Определение суммарных анти-HCV выполнялось с применением тест-системы «Anti-HCVab» производства «Abbott» (США) на иммунохимическом анализаторе «Architect 2000 SR». Выявление генома HCV (РНК) проводилось методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Для качественной детекции генома применялась тест-

система «АмплиСенс HCV-FRT», для количественной — «АмплиСенс HCV-монитор-FRT», производства ЦНИИЭ (Россия). Для оценки активности и стадии патологического процесса в печени использовался индекс гистологической активности (ИГА), предложенный R.G. Knodell и соавт. в 1981 г. Для диагностики стадии патологического процесса применялся индекс фиброза в соответствии со стандартизированной системой «METAVIR»:  $\Phi_0$  — отсутствие фиброза,  $\Phi_1$  — слабый (портальный) фиброз,  $\Phi_2$  — умеренный (с порто-портальными септами),  $\Phi_3$  — тяжелый (с порто-центрными септами) и  $\Phi_4$  — цирроз.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови (ПК) выполнялось на проточном цитометре Facscan фирмы «Becton Dickinson» (США) с использованием тройных комбинаций прямых моноклональных антител (CD95/CD3/CD19, CD25/CD4/CD3, CD25/CD8/CD3, HLA-DR/CD4/CD3, HLA-DR/CD8/CD3, CD16+56/CD3) и изотипических контролей той же фирмы. Количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> определялось от общего числа Т-клеток (CD3), остальные субпопуляции — от общего числа лимфоцитов. Определение в сыворотке крови цитокинов TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием отечественных диагностикумов НПО «Протеиновый контур». Иммуноглобулины классов М, G и А в сыворотке крови определялись стандартным методом простой радиальной иммунодиффузии, а циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) — методом преципитации в полиэтиленгликоле (ПЭГ).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. При этом применялись следующие математико-статистические методы: сравнение групп по количественному признаку непараметрическим ранговым методом U-критерия Манна — Уитни, корреляционный анализ двух признаков непараметрическим методом Спирмена для оценки направления, силы и значимости статистической связи между степенью фиброза и иммунологическими показателями.

### Результаты и их обсуждение

На основании морфологического обследования больные с хронической HCV-инфекцией были разделены на группы по степени фиброза печени —  $\Phi_1$  (n = 32),  $\Phi_2$  (n = 22),  $\Phi_3$  (n = 19) и  $\Phi_4$  (n = 13). В группу с циррозом ( $\Phi_4$ ) входили больные как с компенсированным (7 пациентов), так и декомпенсированным (6 пациентов) циррозом печени. Иммунологическое исследование проводилось

только у тех пациентов, у которых метод ПЦР выявил в крови наличие РНК HCV. У всех обследованных больных ХГС (группы  $\Phi_1$ ,  $\Phi_2$ ,  $\Phi_3$ ) отсутствовали внепеченочные клинические проявления вирусного гепатита, уровень общего билирубина находился в пределах нормы. У 15,4% больных ХГС группы  $\Phi_4$  были выявлены кожные знаки, геморагии и желтуха.

Для изучения Т-клеточного звена иммунной системы у больных ХГС с различной степенью фиброза ( $\Phi_1$ – $\Phi_4$ ) в ПК определяли следующие субпопуляции Т-лимфоцитов: Т-лимфоциты ( $CD3^+$ ), Т-хелперы ( $CD3^+CD4^+$ ), цитотоксические Т-лимфоциты ( $CD3^+CD8^+$ ), Т-киллеры ( $CD3^+CD16+56^+$ ), активированные Т-лимфоциты ( $CD3^+CD25^+$  и  $CD3^+HLA-DR^+$ ), активированные Т-хелперы ( $CD3^+CD4^+CD25^+$  и  $CD3^+CD4^+HLA-DR^+$ ), активированные цитотоксические Т-лимфоциты ( $CD3^+CD8^+CD25^+$  и  $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$ ), а также Т-лимфоциты, экспрессирующие CD95-антиген ( $CD3^+CD95^+$ ) (табл. 1).

Как показано в таблице 1, при анализе содержания Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ) у больных ХГС с различной степенью фиброза и циррозом печени повышение их относительного и абсолютного числа отмечалось только у больных с циррозом печени

( $\Phi_4$ ). В то же время не было выявлено статистически значимых различий ( $p>0,05$ ) по сравнению с другими группами ( $\Phi_1$ – $\Phi_3$ ).

При этом у больных группы  $\Phi_4$  с компенсированным циррозом медиана (Me) относительного количества  $CD3^+CD4^+$  клеток равнялась 35,7%, а с декомпенсированным — Me = 47,95%. У 50% обследованных пациентов с декомпенсированным циррозом относительное количество  $CD3^+CD4^+$  лимфоцитов превышало норму. Таким образом, самые высокие значения относительного содержания  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоцитов наблюдались у больных ХГС на стадии декомпенсированного цирроза печени. Хотя сильный  $CD4^+$  Т-хелперный ответ является необходимым условием для прекращения HCV-инфекции [17, 19, 30, 32], повышение  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоцитов в ПК на стадии тяжелого фиброза ( $\Phi_3$ ) имеет, по-видимому, патологический характер и вызвано развитием на поздних стадиях ХГС аутоиммунных процессов. В связи с этим увеличение в ПК содержания  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоцитов у больных с тяжелым фиброзом ( $\Phi_3$ ) и компенсированным циррозом печени можно рассматривать как прогностически неблагоприятный признак течения заболевания.

Таблица 1

Сравнительный анализ субпопуляционного состава Т-лимфоцитов

Субпопуляции Т-клеток	Здоровые (К) Me	$\Phi_1$ Me	$\Phi_2$ Me	$\Phi_3$ Me	$\Phi_4$ Me
CD3, %	70,0	69,25	69,1	70,1	71,75
$\times 10^9/\text{л}$	1,5	1,58* $\Phi_1/\Phi_2$	1,31	1,67	1,37
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	38,5	37,95	37,3	35,8	40,75
$\times 10^9/\text{л}$	0,87	0,86* $\Phi_1/\Phi_2$	0,7	0,81	0,92
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	25,85	24,35	27,0	27,05	21,95
$\times 10^9/\text{л}$	0,62	0,56	0,48	0,58	0,59
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	1,6**К/ $\Phi_3$	1,35	1,44	1,37	1,95
CD3 <sup>+</sup> CD16.56 <sup>+</sup> , %	4,1*К/ $\Phi_2$	3,5* $\Phi_2/\Phi_4$	3,0	3,7	7,3
$\times 10^9/\text{л}$	0,09К/ $\Phi_2$	0,13	0,07	0,08	0,19
CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %	7,4	8,09	8,02	8,9	11,45
$\times 10^9/\text{л}$	0,18	0,18	0,16	0,2	0,18
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %	—	10,9	10,1	10,7	12,5
$\times 10^9/\text{л}$	—	0,17	0,18	0,2	0,18
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %	—	0,84	0,86	1,1	1,0
$\times 10^9/\text{л}$	—	0,018	0,017	0,023	0,016
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	2,5**К/ $\Phi_4$	2,6* $\Phi_1/\Phi_4$	2,57* $\Phi_2/\Phi_4$	3,1	4,0
$\times 10^9/\text{л}$	0,06*К/ $\Phi_4$	0,06* $\Phi_1/\Phi_4$	0,05* $\Phi_2/\Phi_4$	0,08	0,11
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	—	1,9	1,4	2,1	2,0
$\times 10^9/\text{л}$	—	0,04	0,03	0,044	0,04
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , %	—	1,3	1,6	2,4	2,3
$\times 10^9/\text{л}$	—	0,03	0,04	0,05	0,05
CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> , %	5,35**К/ $\Phi_1$	15,9	12,1**К/ $\Phi_2$	17,1**К/ $\Phi_3$	12,3**К/ $\Phi_4$
$\times 10^9/\text{л}$	0,13**К/ $\Phi_1$	0,34	0,24**К/ $\Phi_2$	0,37**К/ $\Phi_3$	0,25

**Примечание:** Me — медиана; p — уровень статистической значимости критерия Манна — Уитни; \* — различия между группами статистически значимы ( $p<0,05$ ); \*\* — различия между группами статистически значимы ( $p<0,01$ ).

Исследование содержания цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8^+$ ) показало, что медиана значений относительного количества этих клеток постепенно увеличивается по мере роста степени фиброза в группах  $\Phi_1 - \Phi_3$ , снижаясь у больных с циррозом печени ( $\Phi_4$ ). Однако различия между группами не были статистически значимыми ( $p > 0,05$ ). В свою очередь, проведение сравнительного анализа больных с компенсированным и декомпенсированным циррозом печени (группа  $\Phi_4$ ), выявило статистически значимое уменьшение относительного ( $p < 0,01$ ) и абсолютного ( $p < 0,05$ ) количества  $CD3^+CD8^+$  Т-лимфоцитов у больных с декомпенсированным циррозом. Медиана ( $Me$ ) относительного содержания  $CD3^+CD8^+$  Т-клеток при компенсированном циррозе была равна  $Me = 43,5\%$ , а при декомпенсированном —  $Me = 15,4\%$ . Поэтому снижение в ПК относительно числа  $CD3^+CD8^+$  клеток у больных ХГС на стадии компенсированного цирроза может отражать прогрессию заболевания в декомпенсированный цирроз печени.

Считается, что соотношение  $CD3^+CD4^+ / CD3^+CD8^+$  свидетельствует об эффективности клеточного иммунного ответа. Некоторые авторы предполагают, что уменьшение ( $< 1,0$ ) значений этого показателя отражает слабый пролиферативный ответ Т-клеток на вирусные антигены, и связывают это с неблагоприятным прогнозом течения заболевания [4]. В данном исследовании при анализе отклонений от пределов нормы пониженные значения этого показателя у больных ХГС обнаружены у пациентов группы  $\Phi_1$  в 21,9%,  $\Phi_2$  — в 31,8%,  $\Phi_3$  — в 15,4% случаев. В группе  $\Phi_4$  зафиксировано как снижение (у 22,2%), так и повышение (у 33,3%) этого индекса. Оказалось, что наиболее низкие значения соотношения  $CD3^+CD4^+ / CD3^+CD8^+$  были характерны для стадии компенсированного ( $Me = 0,82$ ), а самые высокие — для стадии декомпенсированного ( $Me = 2,69$ ) цирроза. Снижение этого индекса при компенсированном циррозе было обусловлено существенным увеличением количества  $CD3^+CD8^+$  Т-лимфоцитов, а его возрастание при декомпенсированном циррозе печени — как увеличением числа  $CD3^+CD4^+$ , так и резким уменьшением содержания в ПК  $CD3^+CD8^+$  Т-клеток. В связи с этим у больных ХГС на стадии тяжелого фиброза ( $\Phi_3$ ) снижение соотношения  $CD3^+CD4^+ / CD3^+CD8^+$  Т-лимфоцитов менее единицы может отражать прогрессию заболевания с переходом на стадию компенсированного цирроза печени. В то же время существенное возрастание этого показателя ( $> 2,0$ ) у пациентов с ХГС на стадии компенсированного цирроза может свидетельствовать о дальнейшей прогрессии, проявляющейся развитием декомпенсации цирроза печени.

При фенотипическом анализе особо выделяют Т-клетки, экспрессирующие маркеры, чаще свойственные НК-клеткам ( $CD3^+CD16^+56^+$  Т-киллеры). Эта популяция содержит НКТ-клетки и Т-клетки, экспрессирующие антигены CD16 и CD56. Оценка содержания в ПК  $CD3^+CD16^+56^+$  Т-киллеров может иметь важное клиническое значение. Внутрипеченочные НКТ-клетки являются уникальной субпопуляцией Т-лимфоцитов, которая играет важную роль в противоопухолевом иммунитете. В настоящее время исследователи связывают уменьшение содержания и активности регуляторных НКТ-клеток в печени больных ХГС с развитием ГЦК [31]. В настоящем исследовании у больных с начальными стадиями фиброза ( $\Phi_1, \Phi_2$ ), по сравнению со здоровыми лицами (здоровые и  $\Phi_2$ ,  $p < 0,05$ ), было выявлено умеренное снижение содержания  $CD3^+CD16^+56^+$  Т-лимфоцитов. У больных с большей прогрессией заболевания наблюдалось постепенное увеличение их числа, что проявлялось наличием прямой корреляционной связи между количеством Т-киллеров и степенью фиброза ( $r = 0,24$ ;  $p = 0,035$ ). Было обнаружено статистически значимое ( $\Phi_2$  и  $\Phi_4$ ,  $p < 0,05$ ) повышение содержания этих клеток у больных с циррозом печени ( $\Phi_4$ ). Анализ частоты отклонений значений  $CD3^+CD16^+56^+$  Т-клеток от пределов нормы показал, что на поздних стадиях заболевания ( $\Phi_3, \Phi_4$ ) увеличивается частота случаев высокого относительного содержания  $CD3^+CD16^+56^+$  Т-лимфоцитов ( $\Phi_1$  — 9,4%,  $\Phi_2$  — 4,5%,  $\Phi_3$  — 15,4% и  $\Phi_4$  — 33,3% случаев). В группе  $\Phi_4$  максимальные значения содержания Т-киллеров отмечались у пациентов с компенсированным циррозом печени ( $Me = 13,7\%$ ). В то же время, у больных ХГС группы  $\Phi_4$  с декомпенсированным циррозом ( $Me = 4,15\%$ ) было зафиксировано выраженное статистически значимое уменьшение относительного ( $p < 0,01$ ) и абсолютного ( $p < 0,05$ ) количества  $CD3^+CD16^+56^+$  лимфоцитов. Согласно данным литературы [14, 20], Т-киллеры и НКТ-клетки, также, как и  $CD8^+$  Т-лимфоциты, играют важную роль в повреждении печени. Прогрессирование ХГС в цирроз печени связывают с продукцией инвариантными НКТ-клетками профибротических цитокинов 2-го типа (IL-4 и IL-13) [20]. В связи с этим повышение уровня  $CD3^+CD16^+56^+$  Т-киллеров в ПК у больных ХГС с тяжелым фиброзом ( $\Phi_3$ ) можно расценивать как неблагоприятный признак, отражающий прогрессирование патологического процесса с переходом в компенсированный цирроз печени, тогда как значительное уменьшение относительного содержания в ПК  $CD3^+CD16^+56^+$  Т-клеток у больных ХГС при развившемся компенсированном циррозе является прогностически неблагоприятным признаком дальнейшего течения заболевания.

При анализе субпопуляций активированных Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD25^+$  и  $CD3^+HLA-DR^+$ ) наибольший интерес представляют результаты, свидетельствующие о повышении относительного и абсолютного содержания Т-клеток, экспрессирующих «поздний» маркер активации HLA-DR ( $CD3^+HLA-DR^+$ ) у пациентов с высокой степенью фиброза. В данной работе при анализе содержания  $CD3^+HLA-DR^+$  Т-клеток у больных ХГС ( $\Phi_1 - \Phi_4$ ) было обнаружено увеличение числа больных, имеющих повышенное содержание  $CD3^+HLA-DR^+$  Т-лимфоцитов ( $\Phi_1$  — в 9,4%,  $\Phi_2$  — 4,5%,  $\Phi_3$  — 15,4%,  $\Phi_4$  — 33,3% случаев) по мере нарастания степени фиброза, что нашло свое отражение в виде прямой умеренной корреляционной связи между количеством  $CD3^+HLA-DR^+$  Т-клеток и степенью фиброза ( $r=0,25$ ;  $p=0,028$ ). Между группами больных ХГС  $\Phi_1$  и  $\Phi_4$ , а также  $\Phi_2$  и  $\Phi_4$  были установлены статистически значимые ( $p<0,05$ ) отличия по относительному и абсолютному числу этих клеток. В то же время не было зафиксировано достоверных различий в содержании  $CD3^+HLA-DR^+$  Т-лимфоцитов у пациентов с компенсированным и декомпенсированным циррозом печени. Полученные в настоящем исследовании результаты соответствуют положению о том, что повышение числа активированных  $CD3^+HLA-DR^+$  Т-лимфоцитов у больных с ХГС связано со стадией заболевания [28]. Поэтому повышение  $CD3^+HLA-DR^+$  Т-клеток у больных ХГС с умеренным фиброзом может рассматриваться как критерий, характеризующий неблагоприятное течение заболевания.

Для изучения иммунопатогенеза ХГС особый интерес представляло исследование субпопуляции активированных  $CD4^+CD25^+$  Т-клеток, состоящей, в свою очередь, из двух типов клеток: клетки с высокой экспрессией антигена CD25 (собственно регуляторные Т-клетки —  $CD25^{hi}$ ) и клетки с низкой экспрессией CD25 — недавно активированные Т-клетки ( $CD25^{dim}$ ) [16, 21]. В данном исследовании проводилась оценка общего количества  $CD4^+CD25^+$  Т-хелперов. Достоверных различий в содержании  $CD4^+CD25^+$  Т-хелперов у больных ХГС групп  $\Phi_1 - \Phi_3$  не было выявлено. Тем не менее видно, что у пациентов с циррозом печени ( $\Phi_4$ ) наблюдалось некоторое увеличение количества  $CD4^+CD25^+$  Т-лимфоцитов. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в количественном содержании  $CD4^+CD25^+$  Т-клеток у больных ХГС (групп  $\Phi_1 - \Phi_3$ ), а также корреляций между их уровнем и степенью фиброза, у больных со слабым фиброзом ( $\Phi_1$ ) были зафиксированы прямые взаимосвязи между ИГА и относительным ( $r=0,84$ ;  $p=0,001$ ) и абсолютным ( $r=0,89$ ;  $p=0,001$ ) числом  $CD4^+CD25^+$  Т-лимфоцитов. У этих же пациентов обнаружена прямая корреляция ( $r=0,62$ ;  $p=0,023$ ) между относительным количеством  $CD4^+CD25^+$

Т-клеток и активностью цитолитического фермента АлАТ. Эти данные свидетельствуют об участии на начальных стадиях заболевания  $CD4^+CD25^+$  Т-хелперов в патогенезе воспалительного процесса в печени. Кроме того, у больных ХГС группы  $\Phi_3$  обнаружена обратная сильная корреляция между абсолютным содержанием  $CD4^+CD25^+$  Т-лимфоцитов и уровнем вирусной нагрузки ( $r=-0,92$ ;  $p=0,026$ ), что позволяет предполагать участие позитивных по CD25 Т-хелперов в контроле репликации HCV. Таким образом, проведенное исследование подтверждает литературные данные [16, 21] о важной роли  $CD4^+CD25^+$  лимфоцитов в регуляции иммунного ответа при хронической HCV-инфекции.

Корреляционный анализ выявил взаимосвязь увеличения количества активированных  $CD4^+HLA-DR^+$  Т-хелперов с декомпенсацией цирроза печени ( $r=0,82$ ;  $p=0,007$ ). Медиана ( $Me$ ) относительного содержания  $CD4^+HLA-DR^+$  Т-лимфоцитов у больных с компенсированным циррозом была равна  $Me=1,37\%$ , а с декомпенсированным —  $Me=2,75\%$ . По-видимому, повышение числа Т-клеток, экспрессирующих маркер активации HLA-DR ( $CD4^+HLA-DR^+$ ), наряду с увеличением общего количества Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ), отражают активность воспалительного и аутоиммунного процессов на стадии компенсированного цирроза [27, 28].

Исследование содержания активированных ЦТЛ показало, что у больных ХГС в группах с более высокой степенью фиброза ( $\Phi_3$  и  $\Phi_4$ ) увеличивается количество активированных  $CD8^+CD25^+$  и  $CD8^+HLA-DR^+$  цитотоксических Т-лимфоцитов, хотя это повышение не было статистически значимым. Необходимо отметить тот факт, что у больных с декомпенсированным циррозом, несмотря на резкое снижение в периферической крови содержания  $CD3^+CD8^+$  ЦТЛ, уровень активированных  $CD8^+CD25^+$  и  $CD8^+HLA-DR^+$  Т-клеток не изменялся. На основании полученных данных можно говорить о том, что с ростом степени фиброза в иммунной системе происходят процессы, связанные со снижением доли неактивированных ЦТЛ, обусловленные потребностью в достаточно большом количестве активированных ЦТЛ, в результате чего соотношение активированные/неактивированные ЦТЛ смещается в сторону преобладания активированных ЦТЛ.

По современным представлениям, среди механизмов повреждения гепатоцитов при ХГС существенная роль отводится апоптозу [17]. Также известно, что апоптозу принадлежит ключевая роль в регуляции лимфоцитарного пула на стадиях созревания и активации лимфоидных клеток [1, 23]. В данном исследовании было выявлено статистически значимое повышение содержания  $CD3^+CD95^+$  лимфоцитов, характерное для всех групп больных

ХГС ( $\Phi_1 - \Phi_4$ ) по отношению к здоровым лицам. Между самими группами больных отличия в содержании  $CD3^+CD95^+$  клеток отсутствовали. Увеличение иммунореактивных  $CD3^+CD95^+$  клеток, по-видимому, было обусловлено продолжительной антиген-специфической или неспецифической активацией Т-лимфоцитов, что приводило к постоянной персистенции активированных лимфоцитов, преобладающей над процессами их элиминации из периферической крови [27]. У больных ХГС не было выявлено корреляционных взаимосвязей между повышением количества  $CD95^+$  Т-лимфоцитов и степенью фиброза, а также ИГА. В то же время, у больных со слабым фиброзом ( $\Phi_1$ ) была обнаружена прямая корреляция между содержанием  $CD3^+CD95^+$  лимфоцитов и ИГА ( $r=0,62$ ;  $p=0,031$ ), а также АлАТ ( $r=0,57$ ;  $p=0,043$ ). Интересен тот факт, что в общей выборке больных ХГС уровень  $CD95^+$  лимфоцитов прямо коррелировал с содержанием экспрессирующих антиген  $CD25$  Т-хелперов ( $CD4^+CD25^+$ ;  $r=0,62$ ;  $p=0,000$ ) и цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD8^+CD25^+$ ;  $r=0,57$ ;  $p=0,000$ ). Возможно, что активация  $CD95^+$  Т-лимфоцитов препятствовала процессам регулируемого апоптоза в периферической крови, а персистирующие активированные Т-хелперы  $CD4^+CD25^+CD95^+$ , таким образом, могли принимать участие в реализации аутоиммунных механизмов патогенеза хронической HCV-инфекции [23, 27].

Исследование субпопуляций естественных киллеров ( $CD3^-CD16^+56^+$ ,  $CD3^-CD8^+$ ), выполняющих цитотоксическую функцию в противовирусном и противоопухолевом иммунитете, показало, что по сравнению со здоровыми лицами, абсолютное число  $CD3^-CD8^+$  клеток, экспрессирующих  $\alpha$ -цепь антигена  $CD8$  и обладающих большей цитотоксичностью, уменьшалось ( $p<0,05$ ) практически на всех стадиях ХГС ( $\Phi_2$ ,  $\Phi_3$ ,  $\Phi_4$ ) (табл. 2). В свою очередь,

содержание в ПК  $CD3^-CD16^+56^+$  НК-клеток на разных стадиях хронического гепатита, изменялось у больных ХГС как в сторону снижения, так и повышения. По-видимому, уменьшение уровня субпопуляций естественных киллеров ( $CD3^-CD8^+$ ,  $CD3^-CD16^+56^+$ ), а также Т-киллеров ( $CD3^+CD16^+56^+$ ) на начальных стадиях ХГС могло быть связано с миграцией НК-клеток из ПК в печень [14].

Для изучения В-клеточного звена иммунной системы в ПК определялись следующие популяции В-лимфоцитов: В-лимфоциты ( $CD19^+$ ), активированные В-лимфоциты ( $CD3^-CD25^+$ ), а также В-лимфоциты, экспрессирующие  $CD95$ -антиген ( $CD19^+CD95^+$ ). Наряду с этим, оценивали содержание IgM, IgA, IgG, подклассов IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) и уровни высоко-, средне-, низкомолекулярных циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови.

Как видно из таблицы 2, статистически значимые ( $p<0,05$ ) различия, связанные с повышением относительного содержания  $CD19^+$  В-лимфоцитов у больных ХГС, были обнаружены при сравнении групп  $\Phi_2 - \Phi_4$  со здоровыми лицами. В то же время достоверных отличий в количестве В-лимфоцитов между группами больных с ХГС не было зафиксировано.

При проведении сравнительного анализа между больными с компенсированным и декомпенсированным циррозом (группа  $\Phi_4$ ) было выявлено статистически значимое ( $p<0,05$ ) увеличение относительного числа  $CD19^+$  В-клеток у пациентов с декомпенсированным циррозом печени. Кроме того, у больных этой группы ( $\Phi_4$ ) установлена прямая корреляция между процентным содержанием  $CD19^+$  клеток и степенью компенсации цирроза ( $r=0,71$ ;  $p=0,019$ ). Увеличение числа В-клеток в ПК больных ХГС отмечено многими исследователями [4, 25, 26, 29]. В настоящем исследовании было

Таблица 2

Сравнительный анализ субпопуляционного состава НК и В-клеток

Субпопуляции НК и В-клеток	Здоровые (К) Me	$\Phi_1$ Me	$\Phi_2$ Me	$\Phi_3$ Me	$\Phi_4$ Me
$CD3^-CD16^+56^+$ , % $\times 10^9/\lambda$	12,4 0,31	9,65 0,21	9,3 0,2* $K/\Phi_2$	12,0 0,26	9,05 0,11
$CD3^-CD8^+$ , % $\times 10^9/\lambda$	5,3 0,12	3,67 0,08* $K/\Phi_1$	3,97 0,07* $K/\Phi_2$	3,4* $K/\Phi_3$ 0,08* $K/\Phi_3$	2,7 0,09
$CD19^+$ , % $\times 10^9/\lambda$	9,0* $K/\Phi_2$ 0,2* $K/\Phi_2$	10,0 0,23	12,25 0,28	12,7* $K/\Phi_3$ 0,27	11,7* $K/\Phi_4$ 0,28
$CD3^-CD25^+$ , % $\times 10^9/\lambda$	1,83* $K/\Phi_3$ 0,04* $K/\Phi_2$	1,89* $\Phi_1/\Phi_3$ 0,05* $\Phi_1/\Phi_2$	1,7 0,03	1,35 0,03	1,3* $K/\Phi_4$ 0,03
$CD19^+CD95^+$ , % $\times 10^9/\lambda$	0,45* $K/\Phi_1$ 0,008	0,67 0,01	0,75* $K/\Phi_2$ 0,02* $K/\Phi_2$	0,64* $K/\Phi_3$ 0,01	0,75 0,01

**Примечание:** Me — медиана;  $p$  — уровень статистической значимости  $U$ -критерия Манна — Уитни; \* — различия между группами статистически значимы ( $p<0,05$ ).

выявлено, что у больных ХГС по мере прогрессирования заболевания, помимо повышения CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов, отмечалось постепенное снижение относительного числа CD3-CD25<sup>+</sup> активированных В-лимфоцитов. У больных с тяжелым фиброзом ( $\Phi_3$ ) наблюдалось статистически значимое снижение ( $p < 0,05$ ) количества CD3-CD25<sup>+</sup> клеток как по сравнению с пациентами со слабым фиброзом ( $\Phi_1$ ), так и со здоровыми лицами. Полученные результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о том, что у больных ХГС с высокой степенью фиброза, несмотря на увеличение содержания В-клеток, число активированных В-лимфоцитов не повышается [26]. По-видимому, это связано с разобщением процессов пролиферации В-лимфоцитов и активации их части антигенами HCV, в связи с чем происходит накопление в периферической крови наивных неактивированных В-клеток. Исходя из этого, уменьшение относительного числа активированных В-лимфоцитов (CD3-CD25<sup>+</sup>) у больных ХГС, по-видимому, следует расценивать как прогностически неблагоприятный признак. Интересно, что так же, как и в случае прямой взаимосвязи содержания CD95<sup>+</sup> лимфоцитов с уровнем CD25<sup>+</sup> Т-хелперов и ЦТЛ, с помощью корреляционного анализа была обнаружена положительная умеренная связь ( $r = 0,48$ ;  $p = 0,001$ ) между содержанием CD95<sup>+</sup> лимфоцитов и активированных CD3-CD25<sup>+</sup>

В-клеток. На основании этого можно предположить, что повышенная экспрессия CD95-антигена служит целям контроля субпопуляции активированных лимфоцитов.

Определение концентраций иммуноглобулинов классов М, А и G в сыворотке крови показало, что их максимальные концентрации отмечались у больных с циррозом печени (табл. 3). Статистически значимые различия в содержании IgG и IgM у пациентов с циррозом ( $\Phi_4$ ) были зафиксированы по сравнению с другими больными ХГС ( $\Phi_1 - \Phi_3$ ) и группой здоровых лиц. В результате корреляционного анализа были установлены прямые статистически значимые умеренной силы взаимосвязи между стадией заболевания и концентрацией IgA ( $r = 0,26$ ;  $p = 0,018$ ), а также IgG ( $r = 0,24$ ;  $p = 0,027$ ).

Максимальные значения уровней ЦИК всех трех видов наблюдались у больных с циррозом печени ( $\Phi_4$ ) (см. табл. 3). Только у этих пациентов, по сравнению с другими группами больных ХГС ( $\Phi_1 - \Phi_3$ ), отмечалось статистически значимое увеличение уровней как среднемолекулярных, так и низкомолекулярных ЦИК, которые превышали пределы нормы у больных группы  $\Phi_1$  в 56,3%,  $\Phi_2$  — в 47,8%,  $\Phi_3$  — в 60%, а  $\Phi_4$  — в 100% случаев. При анализе взаимосвязи степени фиброза и содержания различных типов ЦИК в сыворотке крови были выявлены прямые умеренные корреляционные связи

Таблица 3

## Сравнительный анализ содержания в сыворотке крови иммуноглобулинов и ЦИК

Показатели	Здоровые (К) Me	$\Phi_1$ Me	$\Phi_2$ Me	$\Phi_3$ Me	$\Phi_4$ Me
IgM, г/л	1,26	1,56	1,4	1,47	2,34
	$p_{K/\Phi_1} < 0,05$ ; $p_{K/\Phi_2} < 0,01$ ; $p_{K/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_2/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_3/\Phi_4} < 0,001$				
IgA, г/л	1,94	2,09	2,05	2,4	2,7
	$p_{K/\Phi_3} < 0,01$ ; $p_{K/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,05$ ; $p_{\Phi_2/\Phi_3} < 0,01$ ; $p_{\Phi_2/\Phi_4} < 0,01$				
IgG, г/л	12,4	13,3	12,46	13,2	15,86
	$p_{K/\Phi_1} < 0,01$ ; $p_{K/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_2/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_3/\Phi_4} < 0,01$				
ЦИК высокомолекулярные, отн. ед.	10	43,5	28	33,5	67,5
	$p_{K/\Phi_1} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_2} < 0,05$ ; $p_{K/\Phi_3} < 0,01$ ; $p_{K/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_2} < 0,05$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_3} < 0,05$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,05$ ; $p_{\Phi_2/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_3/\Phi_4} < 0,001$				
ЦИК среднемолекулярные, отн. ед.	71	99,5	105	97	187
	$p_{K/\Phi_1} < 0,05$ ; $p_{K/\Phi_2} < 0,01$ ; $p_{K/\Phi_3} < 0,01$ ; $p_{K/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_2} < 0,05$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,01$ ; $p_{\Phi_2/\Phi_4} < 0,01$ ; $p_{\Phi_3/\Phi_4} < 0,01$				
ЦИК низкомолекулярные, отн. ед.	181	420	374,5	353	530
	$p_{K/\Phi_1} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_2} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_3} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,05$ ; $p_{\Phi_2/\Phi_4} < 0,01$ ; $p_{\Phi_3/\Phi_4} < 0,01$				

Примечание: Me — медиана; p — уровень статистической значимости U-критерия Манна — Уитни.



уровней среднемолекулярных ( $r = 0,37$ ;  $p = 0,007$ ) и низкомолекулярных ( $r = 0,26$ ;  $p = 0,047$ ) ЦИК и стадии заболевания.

Известно, что низкомолекулярные ИК могут избегать захвата фагоцитами, так как менее эффективно фиксируют комплемент и за счет этого хуже связываются с рецепторами для комплемента на мембранах эритроцитов. В результате они способны циркулировать в крови более длительное время и образовывать депозиты под эндотелием сосудов, так как, в отличие от высокомолекулярных ЦИК, могут проникать сквозь базальную мембрану. В связи с этим выявленное повышение в сыворотке крови уровня низкомолекулярных ИК у больных ХГС может быть одним из условий развития у этой категории больных иммунопатологических реакций, что согласуется с литературными данными об ассоциации HCV-инфекции с рядом аутоиммунных заболеваний [11]. Полученные в результате сравнительного и корреляционного анализов данные свидетельствовали о нарастающей активации В-клеточного иммунного ответа по мере прогрессирования HCV-инфекции.

Важное прогностическое значение при хронических заболеваниях печени могут иметь исследования цитокинового спектра. В данном исследовании в сыворотке крови больных ХГС с различной степенью фиброза были изучены следующие цитокины: IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 и TNF- $\alpha$ . В таблице 4 приведены статистически значимые изменения, выявленные при сравнительном анализе. Было установлено, что у больных ХГС по мере прогрессирования заболевания отмечалось повышение содержания в сыворотке крови IFN- $\gamma$ , IL-10 и TNF- $\alpha$ ,

что согласуется с данными литературы [2, 3, 5, 7, 9, 10, 22]. Увеличение концентрации IFN- $\gamma$  было характерно, в основном, для более поздних стадий заболевания ( $\Phi_3$ ,  $\Phi_4$ ), что подтверждалось статистически значимыми различиями между группами  $\Phi_1$  и  $\Phi_4$  ( $p < 0,05$ ), а также  $\Phi_2$  и  $\Phi_4$  ( $p < 0,05$ ) больных ХГС. Была выявлена прямая статистически значимая связь ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,05$ ) между степенью фиброза и содержанием IFN- $\gamma$ . Предполагается, что прогрессирующее повреждение печени при ХГС коррелирует с увеличением уровня внутрипеченочных цитокинов Th1-типа (IFN- $\gamma$ ) [8]. Такие же закономерности были характерны для уровней IL-10, концентрация которого в сыворотке крови увеличивалась с ростом степени фиброза. Об этом свидетельствовали статистически значимые различия между группами  $\Phi_1$  и  $\Phi_4$  ( $p < 0,05$ ), а также достоверная прямая корреляционная взаимосвязь между содержанием IL-10 и стадией заболевания ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,048$ ). Наряду с этим, наблюдалась тенденция к возрастанию частоты случаев отклонения от нормы концентрации IL-10 на поздних стадиях заболевания ( $\Phi_1$  – в 9%,  $\Phi_2$  – в 36,4%,  $\Phi_3$  – в 35,7% и  $\Phi_4$  – в 55,6% случаев). Повышение содержания TNF- $\alpha$  в сыворотке крови у больных ХГС также имело взаимосвязь с ростом степени фиброза печени. Так, статистически значимые различия в концентрации TNF- $\alpha$  были установлены между группами больных ХГС  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$  ( $p < 0,01$ ),  $\Phi_1$  и  $\Phi_3$  ( $p < 0,05$ ),  $\Phi_1$  и  $\Phi_4$  ( $p < 0,01$ ). При корреляционном анализе выявлена прямая сильная взаимосвязь между степенью фиброза и уровнем TNF- $\alpha$  ( $r = 0,41$ ;  $p = 0,000$ ). Полученные данные, которые также согласуются с результатами других авторов, позволяют рекомендовать

Таблица 4

## Сравнительный анализ содержания цитокинов в сыворотке крови

Цитокины	Здоровые (К) Me	$\Phi_1$ Me	$\Phi_2$ Me	$\Phi_3$ Me	$\Phi_4$ Me
IFN- $\gamma$ , пг/мл	7,43	9,96	11,86	12,1	21,02
		$p_{K/\Phi_4} < 0,01$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,05$ ; $p_{\Phi_2/\Phi_4} < 0,05$			
IL-4, пг/мл	12,4	66,98	20,53	101,4	19,27
		$p_{K/\Phi_1} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_2} < 0,05$ ; $p_{K/\Phi_3} < 0,05$			
IL-10, пг/мл	17,1	52,12	53,55	53,1	71,42
		$p_{K/\Phi_1} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_2} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_3} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,05$			
TNF- $\alpha$ , пг/мл	2,5	2,89	14,02	13,0	16,29
		$p_{K/\Phi_2} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_3} < 0,01$ ; $p_{K/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_2} < 0,01$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_3} < 0,05$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,01$			
IL-1 $\beta$ , пг/мл	10,15	22,27	26,23	46	37,67
		$p_{K/\Phi_1} < 0,05$ ; $p_{K/\Phi_2} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_3} < 0,001$ ; $p_{K/\Phi_4} < 0,001$ ; $p_{\Phi_1/\Phi_4} < 0,01$			

**Примечание:** Me – медиана;  $p$  – уровень статистической значимости  $U$ -критерия Манна – Уитни.



определение в динамике у конкретного больного сывороточной концентрации IFN- $\gamma$ , IL-10 и TNF- $\alpha$  как маркеров прогрессирования ХГС.

При анализе содержания IL-4 и IL-1 $\beta$  в сыворотке крови больных ХГС статистически значимых отличий между различными группами больных ХГС не было выявлено. В то же время у значительной части больных отмечалось увеличение концентрации этих цитокинов по отношению к здоровым лицам. Так, в группах  $\Phi_1 - \Phi_4$  повышение содержания IL-4 наблюдалось у 63,6%, 30%, 57,1% и 25% больных ХГС, а уровня IL-1 $\beta$  — в 22,2%, 23,5%, 50% и 28,6% случаев соответственно. Несмотря на отсутствие значимых отличий между больными ХГС групп  $\Phi_1 - \Phi_4$ , установлена прямая корреляционная взаимосвязь между степенью фиброза и содержанием IL-1 $\beta$  ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,041$ ). На основании этих данных, согласующихся с литературными [2, 3, 9], можно предположить, что увеличение концентрации IL-1 $\beta$  в сыворотке крови больных ( $\Phi_1, \Phi_2$ ) отражает прогрессию ХГС на начальных стадиях заболевания.

Поскольку IL-4 и IL-10 являются цитокинами Th2-типа и участвуют в реализации В-клеточного иммунитета, можно сделать предположение о доминировании гуморального иммунного ответа у больных ХГС, имеющих повышенные концентрации этих цитокинов в сыворотке крови. Полученные данные свидетельствуют о высокой продукции противовоспалительных цитокинов в условиях персистенции HCV, что согласуется с результатами других авторов [3, 6, 12]. Нарастание уровней цитокинов Th2-типа (IL-4 и IL-10) часто было взаимосвязано с увеличением концентрации таких провоспалительных цитокинов, как IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ . По-видимому, на начальных этапах заболевания биологическое значение функциональных изменений в иммунной системе, обусловленных преобладанием продукции интерлейкинов Th2-типа, состоит в сдерживании репликации вируса, а также ограничении интенсивности и распространённости воспаления в печени. В свою очередь, на поздних стадиях ХГС продолжающееся повышение уровней IL-4 и IL-10, а также провоспалительных цитокинов, вызванное постоянной антигенной стимуляцией, приводит к активному фиброгенезу и прогрессированию заболевания.

Выявленные в настоящем исследовании связи между факторами иммунной системы и степенью фиброза позволяют использовать характерные изменения некоторых иммунологических показателей в качестве критериев прогрессирования заболевания. Значимые для прогноза заболевания показатели иммунного статуса, естественно, необходимо определять в динамике (табл. 5).

С этими целями могут изучаться следующие субпопуляции Т- и В-лимфоцитов: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> 56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Снижение соотношения CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов менее 1 является прогностически неблагоприятным признаком на стадиях  $\Phi_1, \Phi_2, \Phi_3$ , а повышение данного индекса выше 2 у пациентов с компенсированным циррозом может служить дополнительным лабораторным критерием, характеризующим течение ХГС на стадии цирроза печени. Наиболее информативными прогностическими показателями гуморального иммунитета, отражающими течение ХГС, являются: повышение концентраций иммуноглобулинов классов А и G, средне- и низкомолекулярных ЦИК, цитокинов Th2-типа (IL-4, IL-10), провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) и IFN- $\gamma$  (Th1).

Таблица 5

**Иммунологические показатели,  
наиболее информативные для прогноза  
течения ХГС**

Показатели иммунной системы (периферическая кровь)	ХГС			
	I стадия (слабый фиброз)	II стадия (умеренный фиброз)	III стадия (тяжелый фиброз)	IV стадия (компенсирован- ный цирроз)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (%)	—	—	—	↑↑
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	—	—	↑↑↑	↓↓↓
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	↓	↓↓	↓↓↓	↑
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> (%)	—	—	↑↑↑	«N»
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> (%)	—	↑	↑	↑↑↑
CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (%)	↓	↓↓	«N»	↓↓↓
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	—	↓↓	↓↓↓	↓
IgA (г/л)	—	—	↑↑	↑↑↑
IgG (г/л)	—	—	↑↑	↑↑↑
ЦИК средн. (отн. ед.)	↑	↑	↑↑	↑↑↑
ЦИК низк. (отн. ед.)	↑	↑	↑↑	↑↑↑
IFN- $\gamma$ (пг/мл)	—	—	↑↑	↑↑↑
IL-10 (пг/мл)	↑	↑	↑↑	↑↑↑
TNF- $\alpha$ (пг/мл)	↑	—	↑	↑↑
IL-1 $\beta$ (пг/мл)	↑	↑↑	—	—

**Примечание:** Прогностически неблагоприятные величины показателей — «N» — значения соответствуют «норме»;  
↑ — повышение значений показателя на 10% выше нормы;  
↑↑ — повышение значений показателя на 20% выше нормы;  
↑↑↑ — повышение значений показателя на 30% выше нормы;  
↓ — уменьшение значений показателя на 10% ниже нормы;  
↓↓ — уменьшение значений показателя на 20% ниже нормы;  
↓↓↓ — уменьшение значений показателя на 30% ниже нормы.

## Выводы

1. Начальные стадии ХГС (слабый и умеренный фиброз) характеризуются слабым Т-клеточным ответом, что обуславливает меньшую цитотоксичность, снижение активности воспалительного процесса в печени и замедление темпов прогрессирования заболевания. Отражением этого является нормальное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов, IFN- $\gamma$  (цитокин Th1-типа) и провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) в периферической крови. На начальных стадиях ХГС происходит переключение иммунного ответа в сторону Th2-типа, что является реакцией организма, направленной на снижение репликационной активности HCV и ограничение распространения фиброзного процесса в ткани печени. Подтверждением этого является увеличение числа В-клеток (CD19 $^{+}$ ), повышение IgA, IgM, IgG, уровней всех типов ЦИК и цитокинов Th2-типа (IL-4, IL-10) в ПК больных ХГС.

2. Поздние стадии ХГС (тяжелый фиброз, компенсированный цирроз) характеризуются усилением активности Т-клеточного звена иммунитета, сопровождающимся нарастанием воспалительного и аутоиммунного процессов в ткани печени, вызванных нарушением цитокиновой регуляции и приводящих к прогрессированию заболевания. Этот процесс выражается повышением в ПК общего числа активированных Т-клеток (CD3 $^{+}$ HLA-DR $^{+}$ ), активированных ЦТЛ (CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ , CD8 $^{+}$ HLA-DR $^{+}$ ), активированных Т-хелперов (CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ , CD4 $^{+}$ HLA-DR $^{+}$ ) и Т-киллеров (CD3 $^{+}$ CD16 $^{+}$ 56 $^{+}$ ), увеличением уровней IFN- $\gamma$  и провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ . На этих стадиях сохраняется доминирование В-клеточного иммунного ответа, но продолжающееся нарастание уровней IL-4 и IL-10, всех типов ЦИК, концентраций IgG и IgA, снижение числа активированных В-лимфоцитов (CD3 $^{+}$ CD25 $^{+}$ ), увеличение количества покоящихся В-клеток (CD19 $^{+}$ ), вызванное постоянной антигенной стимуляцией, сопровождается активным фиброгенезом и дальнейшим прогрессированием заболевания.

3. Стадия декомпенсированного цирроза печени характеризуется дальнейшим увеличением в ПК содержания CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$  Т-лимфоцитов, CD3 $^{+}$ HLA-DR $^{+}$ , CD19 $^{+}$  В-клеток, IgG, IgA, ЦИК, цитокинов IL-10 и IFN- $\gamma$  и дальнейшим понижением активированных В-лимфоцитов (CD3 $^{+}$ CD25 $^{+}$ ). Характерной особенностью этой стадии является резкое снижение цитотоксических Т-лимфоцитов CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$  и CD3 $^{+}$ CD16 $^{+}$ 56 $^{+}$  Т-киллеров, что отражает самый дисбаланс в регуляции иммунного ответа.

4. У больных ХГС отмечаются патогенетически значимые изменения иммунной системы, характеризующиеся взаимосвязью процессов активации, выраженных возрастанием уровней активирован-

ных CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ , CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ , CD3 $^{+}$ CD25 $^{+}$  субпопуляций лимфоцитов, и апоптоза иммунокомпетентных клеток, проявляющегося увеличением числа лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор CD95 $^{+}$ .

## Литература:

1. Буеверов А.О. Клинические аспекты изучения апоптоза при хронических вирусных гепатитах / А.О. Буеверов, А.Е. Грязин // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2006. — № 2. — С. 4–10.
2. Красавцев Е.Л. Уровень некоторых цитокинов и антител к вирусу гепатита С / Е.Л. Красавцев, В.М. Мицура, С.В. Жаворонок и др. // Журн. микробиол. — 2005. — № 5. — С. 103–105.
3. Логинов А.С. Интерлейкины при хроническом вирусном гепатите / А.С. Логинов, Т.Н. Царегородцева, М.М. Зотина // Терапевт. арх. — 2001. — Т. 73, № 2. — С. 17–20.
4. Маммаев С.Н. Показатели клеточного и гуморального иммунитета больных хроническим гепатитом С при лечении интерфероном  $\alpha$  / С.Н. Маммаев // Мед. иммунология. — 2001. — Т. 3, № 4. — С. 557–562.
5. Наследникова И.О. Иммунорегуляторные цитокины и хронизация вирусного гепатита С: клинко-иммунологические параллели / И.О. Наследникова, Н.В. Рязанцева, Е.В. Белобородова и др. // Клин. мед. — 2005. — № 9. — С. 40–44.
6. Приймаги А.С. Иммунорегуляторные Th1- и Th2-цитокины при хронических инфекциях, вызванных вирусами гепатитов В и С / А.С. Приймаги, В.Т. Тефанова, Т.Г. Талло и др. // Вопр. вирусол. — 2003. — № 4. — С. 37–40.
7. Рязанцева Н.В. Цитокины и противовирусный иммунитет / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, В.В. Белоконов и др. // Успехи физиологических наук. — 2006. — Т. 37, № 4. — С. 34–44.
8. Сенников С.В. Экспрессия генов и продукция основных иммунорегуляторных цитокинов при вирусном гепатите С / С.В. Сенников, Д.Х. Курамшин, Н.П. Толоконская и др. // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 4. — С. 10–13.
9. Скляр А.Ф. Цитокиновый профиль при хроническом гепатите С / А.Ф. Скляр, Н.Д. Никифоров, Е.В. Маркелова и др. // Клин. мед. — 2005. — № 10. — С. 40–44.
10. Собчак Д.М. Показатели иммунитета у больных хроническим гепатитом С при различной гистологической активности / Д.М. Собчак, Э.А. Монакова // Клин. мед. — 2004. — № 4. — С. 49–52.
11. Фрейдлин И.С. Иммунные комплексы и цитокины / И.С. Фрейдлин, С.А. Кузнецова // Мед. иммунология. — 1999. — Т. 1, № 1/2. — С. 27–36.
12. Царегородцева Т.М. Цитокины в гастроэнтерологии / Т.М. Царегородцева, Т.И. Серова. — М.: Анархасис, 2003. — 96 с.
13. Afdhal N.H. Evaluation of liver fibrosis: a concise review / N.H. Afdhal, D. Nunes // Am. J. Gastroenterol. — 2004. — Vol. 99, N 6. — P. 1160–1174.
14. Ahmad A. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis / A. Ahmad, F. Alvarez // J. Leukoc Biol. — 2004. — Vol. 76, N4. — P. 743–759.
15. Alter H.J. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome / H.J. Alter, L.B. Seeff // Semin. Liver Dis. — 2000. — Vol. 20, N 1. — P. 17–35.
16. Cabrera R. An immunomodulatory role for CD4(+) CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection / R. Cabrera, Z. Tu, Y. Xu et al. // Hepatology. — 2004. — Vol. 40, N 5. — P. 1062–1071.

17. Chang K.M. Immunopathogenesis of hepatitis virus infection / K.M. Chang // Clin. Liver Dis. — 2003. — Vol. 7, N 1. — P. 89–105.
18. Cramp M. Hepatitis C virus (HCV) specific immune response in anti-HCV positive patients without hepatitis C viremia / M. Cramp, P. Catucci, S. Rossolet al. // Gut. — 1999. — Vol. 44, N 3. — P. 424–429.
19. Day C.L. Broad specificity of virus-Specific CD4<sup>+</sup> T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection / C.L. Day, G.M. Lauer, G.K. Robbins et al. // J. Virol. — 2002. — Vol. 76, N 24. — P. 12584–12595.
20. De Lalla C. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis / C. De Lalla, G. Galli, L. Aldrighetti et al. // J. Immunol. — 2004. — Vol. 173, N 2. — P. 1417–1425.
21. Kanto T. Immunopathogenesis of C Virus Infection: Multifaceted Strategies Subverting Innate and Adaptive Immunity / T. Kanto, N. Hayashi // Intern. Med. — 2006. — Vol. 45, N 4. — P. 183–191.
22. Kawakami Y. Increased frequency of interferon-gamma-producing peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells in chronic hepatitis C virus infection / Y. Kawakami, S. Nabeshima, N. Farusyo et al. // Am. J. Gastroenterol. — 2000. — Vol. 95, N 1. — P. 227–232.
23. Liu W.E. Lymphocyte subset and its apoptosis in chronic hepatitis C / W.E. Liu, D.M. Tan, Z. Zhang et al. // Zhonghua Gan Zang. Bing. Za Zhi. — 2000. — N 8 — P. 269–271.
24. Marcellin P. Fibrosis and disease progression in hepatitis C / P. Marcellin, T. Asselah, N. Boyer // J. Hepatol. — 2002. — Vol. 36, Suppl. 1. — P. 47–56.
25. Morita K. Peripheral lymphocyte subsets vary with stage of hepatitis C virus-associated liver disease / K. Morita, Y. Fukuda, I. Nakano et al. // Hepatogastroenterology. — 2005. — Vol. 52, N 66. — P. 1803–1808.
26. Ni J. Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patient / J. Ni, E. Hembrador, A.M.D. Bisceglie et al. // J. Immunol. — 2003. — Vol. 170, N 6. — P. 3429–3439.
27. Ogawa S. Increase in CD95 (Fas/APO-1) — positive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood derived from patients with autoimmune hepatitis or chronic hepatitis C with autoimmune phenomena / S. Ogawa, K. Sakaguchi, A. Takaki et al. // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2000. — Vol. 15, N 1. — P. 69–75.
28. Panasiuk A. Peripheral blood T, B, and NK cells in relation to histological hepatitis activity and fibrosis stage in chronic hepatitis C / A. Panasiuk, D. Prokopowicz, J. Zak et al. // J. Hepatogastroenterol. — 2003. — Vol. 50, N 49. — P. 178–82.
29. Racanelli V. Molecular Characterization of B Cell Clonal Expansions in the Liver of Chronically Hepatitis C Virus-Infected Patients / V. Racanelli, D. Sansonno, C. Piccoli et al. // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167, N 1. — P. 21–29.
30. Schirren C.A. Liver-Derived Hepatitis C Virus (HCV)-Specific CD4<sup>+</sup> T Cells Recognize Multiple HCV Epitopes and Produce Interferon Gamma / C.A. Schirren, M.C. Jung, Gerlach J.T. et al. // Hepatology. — 2000. — Vol. 32, N 3. — P. 597–603.
31. Shibolet O. NKT and CD8 lymphocytes mediate suppression of hepatocellular carcinoma growth via tumor antigen-pulsed dendritic cells / O. Shibolet, R. Alper, L. Zlotogarov et al. // Int J. Cancer. — 2003. — Vol. 106, N 2. — P. 236–243.
32. Wedemeyer H. Impaired Effector Function of Hepatitis C Virus-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells in Chronic Hepatitis C Virus Infection / H. Wedemeyer, X.S. He, M. Nascimbeni et al. // J. Immunol. — 2002. — Vol. 169, N 6. — P. 3447–3458.

---

Контактный телефон: 8(812)2923201 В.Н. Цыган.