

# Состояние клеточных факторов иммунитета у больных хроническим гепатитом С (ХГС) в зависимости от длительности течения и вирусной нагрузки

Л. Л. Попова, М. В. Комарова

Кафедра инфекционных болезней с эпидемиологией Самарского государственного медицинского университета; Кафедра радиотехники и медицинских диагностических систем Самарского государственного аэрокосмического университета, г. Самара.

## Резюме

**Цель работы:** изучение состояния клеточного звена иммунитета у больных хроническим гепатитом С в фазе репликации вируса в зависимости от генотипа вируса, длительности инфицирования и вирусной нагрузки.

Обследовано 126 больных, контрольная группа 25 практически здоровых доноров. Генотип вируса и вирусную нагрузку в сыворотке крови (количественно) определяли методом ПЦР. Субпопуляции лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+) определяли методом прямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител.

Хронический вирусный гепатит С в фазе репликации вируса в сыворотке крови сопровождается снижением абсолютного числа лейкоцитов, лимфоцитов и их субпопуляций, что наиболее выражено в начале заболевания и при низкой вирусной нагрузке. Зависимости содержания иммунокомпетентных клеток от генотипа вируса, а также взаимосвязи генотипа вируса, длительности инфицирования и вирусной нагрузки друг с другом не найдено.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит С, клеточный иммунитет

## Актуальность

Вирусный гепатит С остается в центре внимания исследователей в силу широкой распространенности среди населения, высокой степени хронизации (до 88%) и тяжестью исходов в виде цирроза печени или гепатоцеллюлярной карциномы [1, 2, 3]. Инфицирование HCV сопровождается мобилизацией неспецифической иммунной защиты (естественные киллеры) и развитием HCV-специфического иммунного ответа [4, 5, 6]. Характер взаимодействия вируса и иммунной системы хозяина изменяется на протяжении инфицирования и зависит от влияния значительного числа факторов, имеющих большое значение для исхода заболевания. В последние годы учеными были определены ведущие из них [7, 8]. В том числе, обсуждается роль таких факторов, как генотип вируса, его концентрация в сыворотке крови больного, его длительность инфицирования и состояние иммунной системы хозяина [9, 10].

**Цель** — изучить влияние генотипа вируса, вирусной нагрузки и предполагаемого срока инфицирования на основные показатели клеточного звена иммунитета специфической (Т-клетки) и неспецифической (NK-клетки) ре-

зистентности у больных хроническим гепатитом С (ХГС).

## Материалы и методы

Среди пациентов Самарского областного гепатологического центра на базе кафедры инфекционных болезней СамГМУ обследована группа больных ХГС (126 человека) в возрасте от 18 до 50 лет (средний возраст  $32,7 \pm 4,6$  года), мужчин — 56,2%, женщин — 43,8%.

Диагноз ХГС поставлен на основании клинико-эпидемиологических, биохимических (параметры цитолиза, мезенхимального воспаления, холестаза), серологических и молекулярно-биологических данных. Для определения anti-HCV в сыворотке использованы скрининговые тест-системы иммуноферментного анализа НПО «Диагностические системы» (г. Нижний Новгород) и «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Определение РНК HCV проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс HCV-Мониторинг-FRT» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора — г. Москва). Вирусную нагрузку определяли количественным методом (линейный диапазон из-

Л. Л. Попова — к. м. н.; М. В. Комарова — к. б. н.

Таблица 1. Показатели клеточного иммунитета в зависимости от длительности заболевания ХГС\*

Показатель	Контроль	До 1 года	1–5 лет	Более 5 лет	p
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,59 $\pm$ 0,15	6,16 $\pm$ 1,13	5,33 $\pm$ 0,33 $p_K=0,007$	4,90 $\pm$ 0,21 $p_K<0,001$	<0,001
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,16 $\pm$ 0,11	1,36 $\pm$ 0,14 $p_K=0,014$	1,89 $\pm$ 0,12	1,61 $\pm$ 0,09 $p_K=0,001$	0,001
CD3 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,54 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,12 $p_K=0,016$	1,28 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,08 $p_K=0,001$	0,001
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,08 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,08 $p_K=0,001$	0,73 $\pm$ 0,06 $p_K<0,001$	0,67 $\pm$ 0,04 $p_K<0,001$	<0,001
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,62 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,06 $p_K=0,045$	0,50 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,03 $p_K<0,001$	0,001
CD16 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,39 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,03 $p_K<0,001$	0,22 $\pm$ 0,02 $p_K<0,001$	0,18 $\pm$ 0,02 $p_K<0,001$	<0,001
CD20 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,34 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,03 $p_K=0,024$	0,012
Лимфоциты, %	32,45 $\pm$ 1,11	27,60 $\pm$ 8,71	36,61 $\pm$ 2,10	34,17 $\pm$ 1,70	0,195
CD3 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	71,72 $\pm$ 0,81	70,00 $\pm$ 1,92	68,09 $\pm$ 2,08	69,58 $\pm$ 1,77	0,501
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	44,96 $\pm$ 0,65	39,40 $\pm$ 4,17	38,67 $\pm$ 1,51 $p_K=0,020$	42,01 $\pm$ 1,65	0,025
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	26,08 $\pm$ 0,54	28,00 $\pm$ 3,46	27,30 $\pm$ 1,62	24,08 $\pm$ 1,07	0,192
CD16 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	17,96 $\pm$ 0,37	12,20 $\pm$ 2,11	12,36 $\pm$ 1,13 $p_K=0,001$	10,86 $\pm$ 1,12 $p_K<0,001$	<0,001
CD20 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	10,16 $\pm$ 0,28	13,60 $\pm$ 1,66	13,45 $\pm$ 1,04	15,48 $\pm$ 1,60 $p_K=0,007$	0,014
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> , ИРИ	1,75 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,51	1,53 $\pm$ 0,11	1,86 $\pm$ 0,12	0,191

Примечание. \* Здесь и в табл. 2 столбец p содержит значения достигнутого уровня значимости по результатам однофакторного дисперсионного анализа. В отдельных ячейках указана статистическая значимость отличий данного показателя от других сравниваемых групп, в частности от контроля.

Таблица 2. Показатели клеточного иммунитета в зависимости от вирусной нагрузки в сыворотке крови у больных ХГС\*

Показатель	Контроль	Низкая	Умеренная	Высокая	p
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,59 $\pm$ 0,15	5,02 $\pm$ 0,46 $p_K=0,002$	5,00 $\pm$ 0,32 $p_K=0,007$	5,27 $\pm$ 0,24 $p_K=0,001$	<0,001
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,16 $\pm$ 0,11	1,57 $\pm$ 0,15 $p_K=0,005$	1,96 $\pm$ 0,11	1,74 $\pm$ 0,09 $p_K=0,018$	0,003
CD3 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,54 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,08 $p_K=0,001$	1,29 $\pm$ 0,13	1,23 $\pm$ 0,07 $p_K=0,014$	0,001
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,08 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,05 $p_K<0,001$	0,78 $\pm$ 0,09 $p_K=0,028$	0,72 $\pm$ 0,04 $p_K<0,001$	<0,001
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,62 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,03 $p_K=0,001$	0,48 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,03 $p_K=0,003$	<0,001
CD16 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,39 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,03 $p_K<0,001$	0,23 $\pm$ 0,03 $p_K=0,001$	0,19 $\pm$ 0,02 $p_K<0,001$	<0,001
CD20 <sup>+</sup> -лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,34 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,02 $p_K=0,001$	0,002
Лимфоциты, %	32,45 $\pm$ 1,11	32,19 $\pm$ 2,27	39,91 $\pm$ 1,84	35,66 $\pm$ 2,12	0,119
CD3 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	71,72 $\pm$ 0,81	68,80 $\pm$ 1,92	66,27 $\pm$ 3,84	69,90 $\pm$ 1,39	0,283
CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	44,96 $\pm$ 0,65	39,33 $\pm$ 1,84	40,64 $\pm$ 3,13	41,12 $\pm$ 1,31	0,067
CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	26,08 $\pm$ 0,54	25,53 $\pm$ 1,93	24,73 $\pm$ 2,13	25,57 $\pm$ 1,11	0,940
CD16 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	17,96 $\pm$ 0,37	12,60 $\pm$ 1,29 $p_K=0,006$	12,27 $\pm$ 2,22 $p_K=0,009$	11,08 $\pm$ 0,87 $p_K<0,001$	<0,001
CD20 <sup>+</sup> -лимфоциты, %	10,16 $\pm$ 0,28	15,73 $\pm$ 1,26 $p_K=0,020$	16,82 $\pm$ 3,35 $p_K=0,010$	12,56 $\pm$ 0,93	0,003
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> , ИРИ	1,75 $\pm$ 0,04	1,67 $\pm$ 0,16	1,74 $\pm$ 0,17	1,76 $\pm$ 0,12	0,963

Рисунок 1. Пути инфицирования HCV-инфекцией



мерения тест-системы: 500-50 000 000 МЕ/мл). Проведение реакции амплификации, анализ и учет результатов проводили при помощи прибора IQ iCyber (BioRad, США).

Состояние клеточного звена иммунитета оценивали по содержанию иммунокомпетентных клеток (ИКК): Т-лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+), натуральных киллеров — NK (CD16+), В-лимфоцитов (CD20+), которые определяли методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител (серия ИКО производства МедБиоСпектр) к CD3, CD4, CD8, CD16, CD20 дифференцировочным антигенам лейкоцитов.

Контрольную группу составили 25 здоровых доноров (средний возраст  $34,5 \pm 3,2$  года).

Статистический анализ данных проводили в среде пакета SPSS 11.5. Для сравнения иммунологических показателей применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим проведением парных сравнений по методу Бонферрони. Изучение эффекта взаимодействия качественных признаков (генотипа вируса, длительности инфицирования и вирус-

ной нагрузки) проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа. Ассоциации, взаимосвязи рассматриваемых группирующих признаков проводили с помощью анализа таблиц сопряженности и критерия хи-квадрат. В тексте работы и таблицах результаты представлены в форме среднего и его ошибки; в диаграммах для удобства визуальной оценки значимости различий по группам представлены средние и их 95% доверительные интервалы.

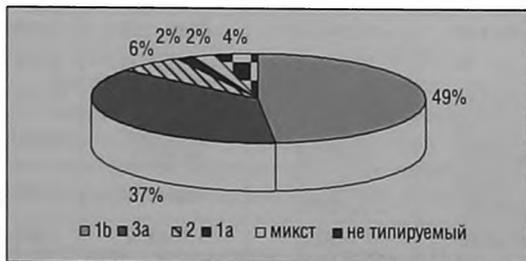
## Результаты и обсуждение

При уточнении предполагаемых путей инфицирования получены следующие данные (рис. 1). Наиболее часто заражение происходило в результате внутривенного введения наркотиков (24,8%). Следующими по частоте названы медицинские (16,2%) и немедицинские (15,8%) манипуляции, а также половой путь (14,1%). Значительным оказалось количество пациентов, которые не смогли определенно указать путь инфицирования (21,2%). Учитывая преимущественно молодой возраст этих больных, у части из них может идти речь о скрываемой наркотической зависимости или о половом пути заражения.

У 78,8% обследованных ( $n=98$ ), имевших в анамнезе достоверные указания на возможный риск инфицирования, представлялось возможным судить о давности заболевания, которая составила от 1 года до 24 лет. У большей части этих пациентов (68,2%), сроки инфицирования не превышали 5 лет ( $4,2 \pm 1,76$ ), составляя до 1 года 8,9% случаев, до 5 лет — 59,3%, свыше 5 лет — 31,8%.

Результаты исследований генотипической структуры HCV-инфекции у наших пациентов

Рисунок 2. Генотипическая структура HCV-инфекции (%)



представлены на рис. 2. Подтверждается известный факт о преобладании в России среди больных хроническим гепатитом С РНК HCV генотипа 1b (48,4%) и доминирующем значении двух генотипов 1b и 3a (85,6%).

На следующем этапе изучено распределение пациентов в зависимости от вирусной нагрузки HCV. Вирусную нагрузку, определяемую количественным методом, по принятым рекомендациям [11, 2] считали: «высокой» при

содержании вируса более 2 млн. копий на мл, «низкой» — менее 1 млн. копий на мл, умеренной при содержании вируса в диапазоне от 1 до 2 млн. копий на мл. По нашим данным при первичной регистрации больных с HCV-инфекцией концентрация вируса в их сыворотке крови оказалась низкой у 9,8% обследованных, умеренной — у 34,2%; высокой — у 56,0%. При сопоставлении генотипа вируса HCV и вирусной нагрузки отмечено, что, независимо от ге-

Рисунок 3 (а, б) Содержание иммунокомпетентных клеток в сыворотке крови в зависимости от длительности инфицирования больных ХГС

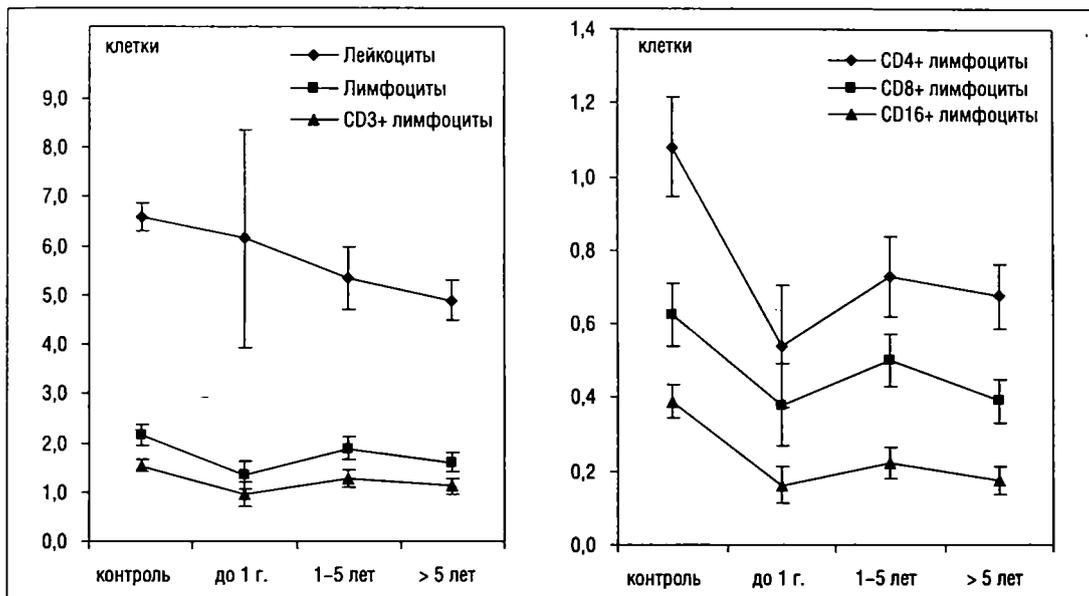


Рисунок 4 (а, б). Содержание иммунокомпетентных клеток в сыворотке крови больных ХГС в зависимости от вирусной нагрузки

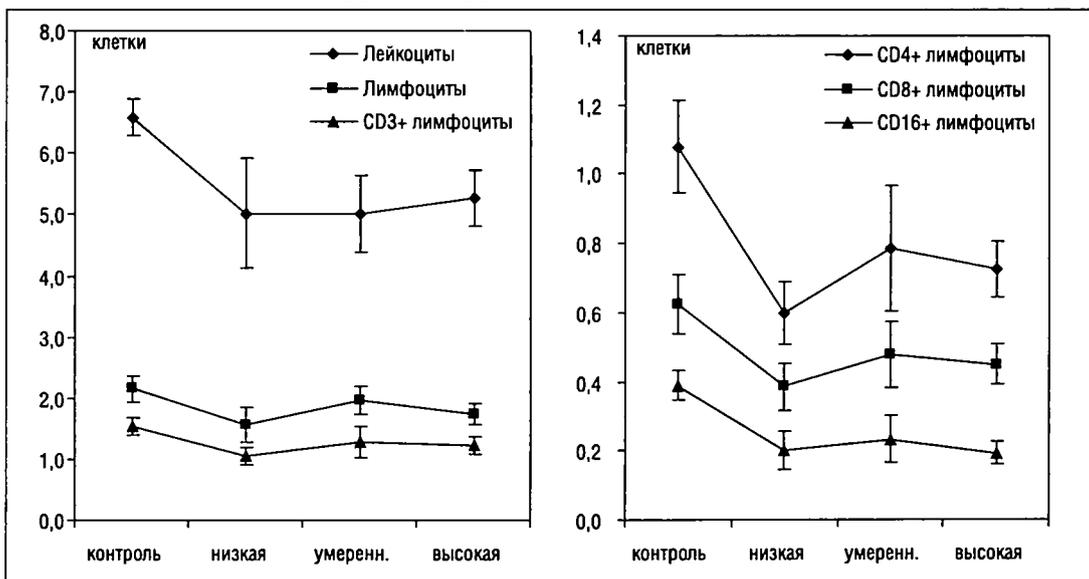
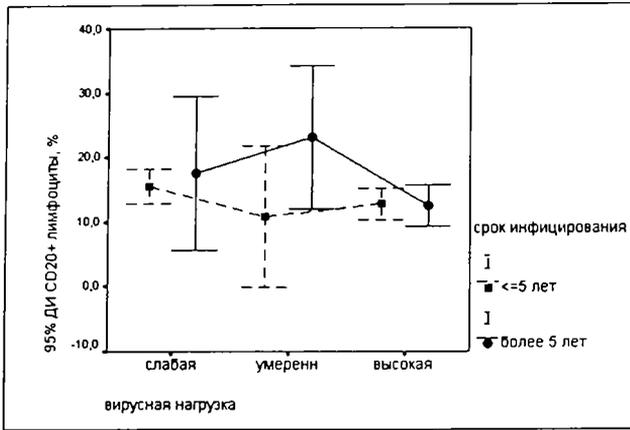


Рисунок 5. Относительное содержание CD20+-лимфоцитов в зависимости от вирусной нагрузки и срока инфицирования HCV



ногипа вируса, почти в полтора раза чаще регистрируется максимальное содержание вируса в сыворотке крови.

Для уточнения характера иммунного ответа при различных сроках инфицирования выделены следующие диапазоны срока давности инфицирования: I группа (до 1 года) — 9,4% обследованных; II группа (2-5 лет) — 41,2%; III группа (более 5 лет) — 49,4%.

Нами изучены возможные взаимосвязи между генотипом вируса, вирусной нагрузкой и длительностью инфицирования пациентов. Анализ таблиц сопряженности не выявил достоверных ассоциаций между этими признаками.

При сопоставлении содержания ИКК у больных с разным генотипом вируса (1b, 3a, 2, 1a, микст) достоверных различий не получено.

Изучая характер изменения содержания лимфоцитов у пациентов с различными сроками инфицирования и величиной вирусной нагрузки, мы получили следующие данные. При любой длительности заболевания абсолютное содержание ИКК ниже, чем в группе здоровых доноров. Значения основных показателей клеточного звена иммунитета выходили за границы нормы в различных подгруппах по CD4+-клеткам в 46-80% случаев, по CD8+ — в 51-84%, по CD16+ — в 70-98%.

Значения параметров ИКК в сравниваемых группах по длительности заболевания и уровни статистической значимости их отличий приведены в табл. 1. Линейный характер снижения количества лейкоцитов при нарастании сроков инфицирования наглядно представлен на рис. 3 а, б. График абсолютного содержания лимфоцитов и их основных субпопуляций отражает выявленный тренд с изломом, соответствующий

уменьшению дефицита ИКК при средних сроках инфицирования. Минимальное содержание лимфоцитов зарегистрировано при недавнем заражении.

При исследовании взаимосвязи содержания ИКК и вирусной нагрузки РНК HCV установлен схожий характер зависимости для CD3+, CD4+, CD8+, CD16+- клеток (табл. 2, рис. 4 а, б). При минимальном содержании вируса в сыворотке крови снижение общего числа лимфоцитов и отмеченных субпопуляций оказалось наиболее выраженным. При нарастании вирусной нагрузки дефицит несколько уменьшается, но при максимальных значениях вновь происходит их снижение, хотя и не столь выраженное, как в первой подгруппе.

Нарушение относительного содержания субпопуляций лимфоцитов, отражающие дисбаланс в клеточном звене иммунитета, наиболее значимо проявилось для CD16+ и CD20+-клеток.

Для изучения возможных взаимодействий рассматриваемых признаков (генотипа вируса, длительности инфицирования и вирусной нагрузки) мы провели двухфакторный дисперсионный анализ для всех попарных сочетаний группирующих признаков. Эффект взаимодействия ( $p=0,032$ ) выявлен для вирусной нагрузки и срока инфицирования по отношению к CD20+-лимфоцитам (рис. 5); при этом для уменьшения степеней свободы и получения значимых закономерностей все больные со сроком инфицирования менее 5 лет были объединены в одну группу. Установлено, что, если у больных со слабой или высокой вирусной нагрузкой показатели CD20+-клеток одинаковы при любом сроке инфицирования, то у больных с умеренной вирусной нагрузкой со сроком инфицирования более 5 лет содержание CD20+-лимфоцитов почти вдвое ниже ( $10,75 \pm 3,42\%$ ), чем у больных с такой же нагрузкой, но сроком инфицирования менее 5 лет ( $23,00 \pm 4,31\%$ ).

## Выводы

1. Хронический вирусный гепатит С в фазе репликации вируса в сыворотке крови сопровождается снижением абсолютного числа лейкоцитов, лимфоцитов и их субпопуляций (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+).

2. Зависимости содержания ИКК от генотипа вируса не найдено.

3. Минимальные значения абсолютного содержания ИКК зарегистрированы для случаев недавнего заражения и низкой вирусной нагрузки.

4. Относительное содержание лимфоцитов имеет тенденцию к повышению, преимущественно за счет CD20<sup>+</sup>-клеток.

### Литература

1. Радченко В.Г., Стельмах В.В., Козлов В.К. Оптимизация этиопатогенетической терапии хронического гепатита С: Пособие для врачей-терапевтов, гастроэнтерологов, гепатологов, инфекционистов. СПб.: СПбГМА; 2004.
2. Мухин Н.А., ред. Практическая гепатология. М.; 2004.
3. Bowen D.G., Walker S.M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. Nature. 2005; 136: 946-52.
4. Курамшин Д.Х., Толоконская Н.П., Кожевников В.С. и др. Субпопуляционная структура иммунокомпетентных клеток периферической крови и содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных вирусным гепатитом С и сочетанным вариантом С+В. Микробиология, эпидемиология, иммунобиология 2002; 1: 42-8.
5. Никитин И.Г. Интерферонотерапия хронического гепатита С и клеточно-опосредованный иммунитет. Клиническая медицина 1999; 6: 33-7.
6. Thimme R., Bukh J., Spangenberg H.C., Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(24): 15661-8.
7. Серов В.В., Бушуева Н.В., Игнатова Т.М., Апросина З.Г. Факторы вируса и хозяина в развитии и прогрессировании хронических вирусных гепатитов В и С. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2006; 4: 12-22.
8. Cooper S. Hepatitis C virus and the human immune system: a scientist's canon and fugue. Liver Disease Management & Transplant Program. 2005.
9. Собчак Д.М., Корочкина О.В. Оценка показателей Т-клеточного иммунитета и медиаторов иммунного ответа у больных хроническим гепатитом С. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007; 2: 37-42.
10. Cox A.L., Mosbrugger T., Mao Q. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. J Exp Med. 2005; 201(11): 1741-52.
11. Диагностика и лечение хронических вирусных гепатитов В, С и D у детей. М.; 2002.

## Гепатопротективная терапия препаратом ГЕП-В HCV-инфицированных потребителей инъекционных наркотических средств

И. В. Безъязыкова, Д. В. Русяков, П. Л. Кузнецов, В. К. Веревищikov, В. М. Борзунов  
Кафедра инфекционных болезней ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Росздрави, г. Екатеринбург

### Резюме

*Имея высокий хронизирующий потенциал, вирусный гепатит С доминирует в структуре хронических воспалительных заболеваний печени. Проведена комплексная клинико-лабораторная оценка эффективности гепатопротектора Геп-В в группе больных HCV-инфекцией, являющихся потребителями инъекционных наркотиков. Получение данных об успешном применении препарата Геп-В позволяет рекомендовать его применение в комплексной терапии остро вирусного гепатита С.*

**Ключевые слова:** острый вирусный гепатит С, потребители инъекционных наркотиков, гепатопротекторы.

### Введение

Вирусный гепатит С продолжает оставаться глобальной проблемой современного здравоохранения [1, 2, 3, 4]. На его долю приходится до 20% острых гепатитов, 70% хронических гепатитов, 40% циррозов печени в терминальной стадии и от 15-20% до 60-70%

случаев гепатоцеллюлярной карциномы [5, 6, 7, 8].

Возбудитель вирусного гепатита С обладает наиболее высоким хронизирующим потенциалом [2, 3]. В мире инфицировано HCV порядка 500 млн. человек, что достигает 10% всей популяции [6, 9]. На долю вирусного гепатита С в России приходится около 9,4% от общего числа случаев всех вирусных гепатитов [10]. В Российской Федерации ежегодно регистрируется рост заболеваемости острым гепатитом С с 3,2 на 100 тыс. населения в 1994 году до 20,7 на 100 тыс. населения в 2000 году [3, 11]. На территории Свердловской области в 2007 г. показатель заболеваемости по острой HCV-инфекции составил 6,67 на 100 тыс. человек, по хроническому вирусному гепатиту С — 35,09.

И. В. Безъязыкова — аспирант кафедры инфекционных болезней ГОУ ВПО УГМА Росздрави;

Д. В. Русяков — ассистент кафедры инфекционных болезней ГОУ ВПО УГМА Росздрави;

П. Л. Кузнецов — к. м. н., ассистент кафедры инфекционных болезней ГОУ ВПО УГМА Росздрави;

В. К. Веревищikov — к. м. н., доцент кафедры инфекционных болезней ГОУ ВПО УГМА Росздрави;

В. М. Борзунов — д. м. н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней ГОУ ВПО УГМА Росздрави.