

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ NS3Ag ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ С: СВЯЗЬ С КЛИНИКО- ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ И ГЕНОТИПАМИ HCV

*Правдолюбова И. А., Дуданова О. П.*

Петрозаводский государственный университет. Кафедра пропедевтики внутренних болезней.

*Правдолюбова Ирина Александровна*

*E-mail: pravdolyubova@mail.ru*

### РЕЗЮМЕ

**Цель:** определить особенности экспрессии NS3Ag в печени и зависимость некротически-воспалительного процесса от уровня и локализации NS3Ag в гепатоцитах у больных хроническим гепатитом С (ХГС) с различными генотипами вируса.

**Материалы и методы:** обследован 31 больной ХГС: 14 (45%) — с 1b генотипом и 17 (55%) — с 3a генотипом HCV. NS3Ag выявлялся в ткани печени иммуногистохимическим методом с помощью тест-систем «Novocastra» УК. Оценивались традиционные лабораторные показатели, индекс гистологической активности по Knodell и модифицированным методом, индекс склероза по Metavir.

**Результаты:** уровень NS3Ag в цитоплазме гепатоцитов значительно (в 140 раз) превышал таковой в ядрах. Локализация NS3Ag в цитоплазме была различной: у 19 (61%) больных — периферической/около-мембранной и у 12 (39%) — равномерной диффузной. Выраженность некротически-воспалительного синдрома по лабораторным и гистологическим данным была выше при периферической локализации NS3Ag, чем при диффузной. Жировая, гидропическая дистрофия гепатоцитов и мелкоклеточная дисплазия были более значительными при высокой концентрации NS3Ag. Распределение NS3Ag в цитоплазме гепатоцитов не зависело от генотипа HCV. Однако биохимическая активность и выраженность показателей воспаления и фиброза во всех зонах ацинуса были выше у пациентов с 1b генотипом HCV, несмотря на более низкий уровень NS3 по сравнению с группой пациентов с 3a генотипом.

**Заключение:** при ХГС цитоплазматическая экспрессия NS3Ag преобладала над ядерной. При около-мембранной локализации NS3Ag, в отличие от равномерной диффузной, показатели HVC были выше. От уровня NS3Ag прямо зависела степень паренхиматозного повреждения и мелкоклеточной дисплазии гепатоцитов. При 1b генотипе HCV показатели активности гепатита и фиброз были выше, а концентрация NS3Ag — ниже, чем при 3a генотипе.

**Ключевые слова:** хронический гепатит С, NS3Ag, генотипы HCV, иммуногистохимическое исследование, некротическое воспаление, фиброз.

### SUMMARY

**Aim:** we have analyzed the peculiarities of NS3Ag expression in hepatocytes and dependence of necroinflammation on the NS3Ag level and on its localization in hepatocytes in patients with different genotypes of HCV.

**Materials and methods:** 31 patients with chronic hepatitis C were examined, 14 (45%) of them with HCV genotype 1b and 17 (55%) with genotype 3a. NS3Ag was detected in the liver tissue by immunohistochemistry («Novocastra» kit, UK). Routine laboratory analyses were performed. Staging and grading were assessed according to the Knodell score and a modified method, and sclerosis index was determined according to the Metavir scale.

**Results:** the level of NS3Ag in the cytoplasm of hepatocytes was 140 fold higher than in the nucleus. Different patterns of NS3Ag localization in the cytoplasm were observed: in 19 (61%) patients it was detected peripherally near the plasma membrane, whereas in 12 (39%) patients it was diffusely distributed in the cytoplasm. Necroinflammation was more pronounced in the case of peripheral near-membrane NS3Ag localization. The fatty and hydropic degeneration and small cell dysplasia of hepatocytes were more significant in high NS3Ag concentration. No correlation was revealed between the intracytoplasmic NS3Ag localization and the genotype of HCV. However, biochemical activity and the severity of inflammation and fibrosis in all zones of the acinus were higher in patients with HCV genotype 1b, in spite of the lower viral load compared with the patients with genotype 3a.

**Conclusions:** in chronic hepatitis C, cytoplasmatic expression of NS3Ag prevailed over nuclear expression. Severity of necroinflammation was higher in patients with peripheral near-membrane NS3Ag localization than in those with uniform diffuse localization. The degree of parenchymatous damage and small cells dysplasia of hepatocytes depended on the level of NS3Ag in hepatocytes. In patients with HCV genotype 1b, biochemical and histologic indicators of activity were higher, while NS3Ag concentration was lower compared to genotype 3a.

**Keywords:** chronic hepatitis C, NS3Ag, HCV genotypes, immunohistochemistry, necroinflammation, fibrosis.



Особенности биологического репликативного цикла вируса гепатита С при хроническом гепатите С (ХГС) представляют значительный интерес не только для вирусологов и молекулярных биологов, но и для клиницистов в связи с потребностью в более глубоком понимании интимных механизмов взаимодействия вируса и хозяина, особенностей сборки вируса, характера взаимодействия вирусных протеинов с внутриклеточными структурами гепатоцитов и возможного повреждающего действия на них, влияния данных процессов на выраженность некротически-воспалительного синдрома (НВС) в печени и клиническое течение ХГС. Кроме того, определение вирусных протеинов непосредственно в ткани печени позволяет диагностировать латентную инфекцию, при которой вирусный ген в крови находится в низкой, не определяемой концентрации, или отсутствует вообще. В отечественной и зарубежной литературе имеется немногочисленная информация о диагностическом и клиническом значении определения различных вирусных протеинов HCV в ткани печени иммуногистохимическим (ИГХ) способом. Наибольшее значение авторы придают определению NS3Ag, который является маркером репликативной активности вируса гепатита С [1].

Многие исследователи ставили перед собой задачу выявить взаимосвязь между уровнем NS3Ag в ткани печени и биохимическими, гистологическими показателями НВС при ХГС. При этом для оценки экспрессии данного вирусного белка они использовали два метода: подсчет инфицированных NS3Ag гепатоцитов [2–5] или оценку окрашенных клеток в препарате полуколичественно по 4-балльной системе [6–9]. Никто из исследователей не определял число вирусных частиц в гепатоцитах для более точной оценки концентрации вирусных протеинов и ее связи с показателями активности и фиброза при гепатите.

Большинство авторов не нашли положительных корреляций между экспрессией вирусных протеинов и клинико-лабораторными [1–4, 8], гистологическими данными (паренхиматозным повреждением, воспалением и фиброзом) при ХГС [1, 2, 5, 6, 8–14]. Некоторые исследователи выявили отрицательную связь между количеством NS3-положительных гепатоцитов и активностью воспалительного процесса в ткани печени [5, 15] и лабораторными маркерами цитолиза [6], объясняя данный факт наличием иммунотолерантности к NS3Ag.

Данные исследователей о локализации протеинов вируса гепатита С в ядрах печеночных клеток противоречивы. Большинство авторов подтверждает ядерную локализацию вирусных белков (Core, NS3, NS4, NS5A) в гепатоцитах [2, 6, 12, 13, 14, 16], другие обнаруживают их только в цитоплазме гепатоцитов [5, 17]. Нет анализа влияния топографии вирусных протеинов на выраженность воспалительного процесса в печени. Кроме того, в доступных

литературных источниках отсутствует информация об особенностях экспрессии NS3Ag и влиянии его уровня и топографии на клиническое течение ХГС при различных генотипах вируса.

Целью исследования явилось определение уровня и особенностей локализации NS3Ag в гепатоцитах при ХГС, связи концентрации и топографии данного протеина с показателями НВС при различных генотипах вируса гепатита С.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследован 31 пациент ХГС: 14 (45%) — с 1b генотипом HCV и 17 (55,0%) — с 3a генотипом. Мужчин было 21 (68,0%), женщин — 10 (32,0%), средний возраст составил  $38,23 \pm 15,94$  года (22–62), ИМТ —  $24,28 \pm 3,17$  кг (20,2–29). Хронический гепатит слабой активности выявлялся у 15 (48,0%) пациентов, умеренной — у 7 (22,0%) и высокой — у 9 (30,0%), ни у кого из больных не было признаков трансформации гепатита в цирроз печени.

Диагноз ХГС устанавливался на основании комплексного клинико-лабораторного, серологического, вирусологического и гистологического исследования. У всех пациентов определялись серологические маркеры HCV-инфекции (AbHCVIgM, AbHCVIgG), а также — геномы вируса гепатита С в крови и ткани печени методом ПЦР (тест-системы «Амплиценс», производства ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва). Генотип HCV определялся с помощью наборов «Амплиценс HCV-Генотип», ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ. Уровень виремии оценивался полуколичественным методом в 4-балльной системе.

Ткань печени фиксировалась в 10% формалине, помещалась в парафин, готовились срезы толщиной 3–4 мк, которые окрашивались гематоксилин-эозином и по Ван Гизону. Оценка гистологических параметров выполнялась по методу Knodell R. G., и некоторые параметры — модифицированным методом для более точной количественной регистрации патологических изменений в печени. При увеличении  $\times 150$  в 10 полях зрения определялись следующие морфологические показатели: портальная инфильтрация (ПИ) в традиционной 4-балльной системе, перипортальная инфильтрация (ППИ) — в процентах от периметра портального тракта, занимаемого инфильтратом, проникающим внутрь дольки, центральная инфильтрация (ЦИ) — в процентах от периметра центральной вены, внутريدольковая воспалительная инфильтрация (ВИ) — в процентах от общей площади поля зрения окуляра. По такому же принципу оценивался внутридольковый фиброз (ВФ). Портальный (ПФ) и центральный фиброз (ЦФ) — оценивались по 4-балльной системе. Также при увеличении  $\times 150$  в 10 полях зрения подсчитывалось среднее число клеток в состоянии

Таблица 1

КОЭФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ (R) МЕЖДУ ДАННЫМИ ИГХ-ИССЛЕДОВАНИЯ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У ПАЦИЕНТОВ С ХГС				
	ККЖД	ГД	МКД	ККД
Количество NS3Ag-инфицированных гепатоцитов	0,64*	0,34*	0,81***	0,11
Среднее число вирусных протеинов (NS3Ag) в гепатоците	0,34*	0,88**	0,52*	0,09

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$

Таблица 2

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ДАННЫХ У ПАЦИЕНТОВ ХГС С ПРЕИМУЩЕСТВЕННО ДИФFUЗНЫМ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИМ/ОКОЛОМЕМБРАНЫМ РАСПРЕДЕЛЕНИЕМ NS3AG В ЦИТОПЛАЗМЕ ГЕПАТОЦИТОВ (M ± m)		
Морфологические и лабораторные показатели	Преимущественно диффузное распределение NS3Ag в цитоплазме гепатоцитов (I группа)	Преимущественно периферическое распределение NS3Ag в цитоплазме гепатоцитов (II группа)
НГ, число клеток	3,98 ± 3,01	15,25 ± 16,01*
ККЖД, число клеток	2,25 ± 2,7	37,71 ± 96,57*
МКЖД, число клеток	11,85 ± 23,7	17,35 ± 41,89
ГД, число клеток	21,82 ± 23,77	23,28 ± 24,54
МКД, число клеток	3,1 ± 1,14	3,55 ± 2,7
ККД, число клеток	0,17 ± 0,2	0,7 ± 0,33***
ПИ, баллы	2,21 ± 0,75	2,89 ± 1,04
ППИ, %	23,43 ± 13,36	50,13 ± 30,88*
ВИ, %	2,13 ± 1,61	8,17 ± 8,55*
ЦИ, %	6,67 ± 9,42	18,71 ± 24,32
ПФ, баллы	1,79 ± 1,15	2,54 ± 1,25
ВФ, %	0,57 ± 0,65	5,05 ± 8,65*
ЦФ, баллы	0,51 ± 0,7	0,94 ± 1,45
АЛАТ, МЕ/л	107,89 ± 14,25	95,01 ± 71,25
АСАТ, МЕ/л	28,05 ± 12,67	46,5 ± 28,21*
Общий билирубин, мкмоль/л	18,25 ± 9,56	35,6 ± 22,54*
Прямой билирубин, мкмоль/л	5,14 ± 4,38	14,95 ± 14,61
ЩФ, МЕ/л	137,36 ± 3,33	174,9 ± 129,15
γ-глобулины, г/л	13,11 ± 3,14	16,38 ± 4,16
Лейкоциты, Г/л	7,12 ± 1,29	5,36 ± 2,15*
Лимфоциты, Г/л	2,74 ± 1,3	2,24 ± 1,11
СОЭ, мм/час	3,01 ± 1,15	13,33 ± 11,72**

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .



крупно- и мелкокапельной жировой дистрофии (ККЖД, МКЖД), гидропической дистрофии (ГД) и число некротизированных гепатоцитов (НГ).

В 10 полях зрения при увеличении  $\times 600$  определялось число гепатоцитов с признаками мелко- и крупноклеточной дисплазии (МКД, ККД). Учитывались общепринятые признаки дисплазии: большие и малые гепатоциты с увеличенными ядрами и увеличенным ядерно-цитоплазматическим отношением, многоядерные гепатоциты, гиперхромия ядер, выделяющиеся ядрышки [18, 19].

В печени определялся NS3-протеин вируса гепатита С ИГХ-методом (kit «Novocastra», UK). При увеличении  $\times 600$  в 10 полях зрения подсчитывалось количество инфицированных гепатоцитов (КИГ) и среднее число вирусных протеинов в гепатоците (ЧВПГ). Оценивалась локализация вирусных протеинов: в ядрах гепатоцитов и в цитоплазме клетки. При оценке вирусных протеинов в цитоплазме выделялись следующие группы: с преимущественно равномерным диффузным (более чем в 90% NS3-положительных гепатоцитов) расположением NS3Ag (рис. 1 на цветной вклейке) и с преимущественно периферическим/около-мембранным расположением (рис. 2 на цв. вклейке).

Из данных анамнеза и лабораторных тестов учитывались: давность заболевания, активность аминотрансфераз, уровень общего билирубина и его фракций, щелочной фосфатазы,  $\gamma$ -глобулинов, число лейкоцитов, лимфоцитов периферической крови и СОЭ. Всем пациентам выполнялось УЗИ органов брюшной полости, эзофагогастродуоденоскопия. Статистическая обработка данных выполнялась с помощью непараметрических методов исследования с использованием коэффициента корреляции рангов Спирмена. Сравнение результатов производилось по критерию  $\chi^2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

NS3Ag в ткани печени был выявлен у всех (100%) обследованных пациентов. Среднее КИГ в поле зрения составило  $84,07 \pm 65,8$ , а их площадь —  $45,41 \pm 33,43\%$  от поля зрения окуляра. Среднее ЧВПГ составило  $9,86 \pm 8,01$ . Отмечалась положительная корреляционная связь между ЧВПГ и КИГ —  $r = 0,56$  ( $p < 0,01$ ). У 27 (87%) пациентов были выявлены единичные включения NS3Ag в ядрах отдельных гепатоцитов: процент гепатоцитов с ядерной локализацией составил  $1,76 \pm 0,89\%$ , а ядерная концентрация антигена —  $0,07 \pm 0,04$ . В купфферовских клетках и клетках воспалительного инфильтрата портальных трактов экспрессия NS3Ag не отмечалась.

Между уровнем NS3Ag в ткани печени и уровнем вирусемии достоверной корреляционной связи не было ( $r = 0,1$ ;  $p > 0,05$ ). Однако определялись достоверные положительные корреляционные связи между КИГ, ЧВПГ и гистологическими показателями паренхиматозного повреждения и МКД.

Так коэффициенты корреляции между КИГ и ЧВПГ с ККЖД составили —  $r = 0,64$  ( $p < 0,05$ ),  $r = 0,34$  ( $p < 0,05$ ) соответственно; с ГД —  $r = 0,34$  ( $p < 0,05$ ),  $r = 0,88$  ( $p < 0,01$ ) соответственно; с МКД —  $r = 0,81$  ( $p < 0,005$ ),  $r = 0,52$  ( $p < 0,05$ ) соответственно. Между уровнем NS3Ag и выраженностью ККД корреляционных связей выявить не удалось (табл. 1).

Между данными ИГХ-исследования и большинством лабораторных показателей НВС достоверных связей не выявлялось: коэффициент корреляции КИГ, ЧВПГ с уровнем АЛАТ составил —  $r = -0,14$  ( $p > 0,05$ ),  $r = -0,44$  ( $p > 0,05$ ); с уровнем общего билирубина —  $r = -0,01$  ( $p > 0,05$ ),  $r = 0,003$  ( $p > 0,05$ ); с уровнем ЩФ —  $r = 0,33$  ( $p > 0,05$ ),  $r = 0,4$  ( $p > 0,05$ ); с уровнем СОЭ —  $r = 0,28$  ( $p > 0,05$ ),  $r = 0,13$  ( $p > 0,05$ ) соответственно. Между ЧВПГ и числом лимфоцитов периферической крови была выявлена тесная связь —  $r = 0,6$  ( $p < 0,05$ ).

По характеру распределения NS3Ag в цитоплазме гепатоцитов было выделено 2 группы пациентов: с преимущественно диффузным распределением NS3Ag (I группа,  $n = 12$ –39,0% больных) и с преимущественно периферической/около-мембранной локализацией (II группа,  $n = 19$ –61,0% больных). Средний возраст в I группе составил  $29,25 \pm 8,61$  года, во II —  $42,22 \pm 17,18$  года ( $p < 0,05$ ), давность заболевания —  $5,75 \pm 2,5$  года и  $8,87 \pm 5,98$  года ( $p > 0,05$ ) соответственно.

У пациентов II группы отмечалось достоверно большее число НГ, число печеночных клеток в состоянии ККЖД и ККД, выше были такие показатели воспаления и фиброза как ППИ, ВИ, ВФ, а также уровни АСАТ, общего билирубина и СОЭ (табл. 2). Данная закономерность, вероятно, была связана с активной презентацией NS3Ag на мембране гепатоцитов, сенсбилизацией лимфоцитов и их повреждающим действием на печеночные клетки.

В связи с неоднородностью исследуемой группы в отношении генотипов HCV больные были распределены на 2 группы: с 1b генотипом — 14 (45,0%) больных (группа № 1), с 3a — 17 (55,0%) больных (группа № 2). Средний возраст пациентов группы № 1 составил  $43,2 \pm 13,15$  года, группы № 2 —  $29,51 \pm 9,35$  года ( $p < 0,05$ ), давность заболевания —  $8,25 \pm 5,18$  года,  $6,2 \pm 2,68$  года ( $p > 0,05$ ) соответственно. Инфицированными вирусом в среднем оказались  $23,03 \pm 13,31\%$  гепатоцитов у больных группы № 1 и  $50,06 \pm 35,24\%$  ( $p < 0,05$ ) — у больных группы № 2. Распределение антигена в цитоплазме гепатоцитов не зависело от генотипа вируса. Так равномерно диффузное распределение NS3Ag в цитоплазме гепатоцитов отмечалось у 5 (36%) пациентов с 1b генотипом и у 7 (41%,  $p > 0,05$ ) — с 3a генотипом, а преимущественно периферическая/около-мембранная локализация NS3Ag была выявлена у 9 (64%) пациентов с 1b генотипом и у 10 (59%,  $p > 0,05$ ) — с 3a генотипом. Отмечалась тенденция к более высокому ЧВПГ

Таблица 3

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ДАННЫХ У ПАЦИЕНТОВ ХГС С РАЗНЫМИ ГЕНОТИПАМИ ВИРУСА (M ± m)		
Морфологические и лабораторные показатели	1b генотип (I группа)	3a генотип (II группа)
НГ, число клеток	23,32 ± 18,06	4,3 ± 2,46*
ККЖД, число клеток	7,02 ± 13,11	3,1 ± 2,67
МКЖД, число клеток	6,04 ± 13,17	7,9 ± 19,35
ГД, число клеток	9,7 ± 13,61	31,7 ± 29,25*
МКД, число клеток	3,1 ± 0,78	2,75 ± 1,14
ККД, число клеток	0,76 ± 0,32	0,25 ± 0,28**
ПИ, баллы	3,16 ± 1,06	2,25 ± 0,99*
ППИ, %	57,01 ± 35,4	27,65 ± 22,89*
ВИ, %	12,47 ± 9,67	2,3 ± 1,32*
ЦИ, %	35,89 ± 25,31	3,33 ± 8,16*
ПФ, баллы	2,68 ± 1,54	1,88 ± 1,1
ВФ, %	8,5 ± 10,78	0,63 ± 0,51*
ЦФ, баллы	2,22 ± 1,43	0,25 ± 0,61*
АЛАТ, МЕ/л	122,14 ± 71,25	103,14 ± 43,42
АСАТ, МЕ/л	56,2 ± 37,33	35,33 ± 14,67
Общий билирубин, мкмоль/л	39,76 ± 26,63	23,72 ± 14,64
Прямой билирубин, мкмоль/л	14,84 ± 16,95	10,2 ± 6,78
ЩФ, МЕ/л	127,57 ± 50,22	146,47 ± 16,22
γ-глобулины, г/л	13,22 ± 4,05	12,26 ± 4,1
Лейкоциты, Г/л	4,72 ± 1,15	7,78 ± 1,4***
Лимфоциты, Г/л	1,6 ± 0,39	3,37 ± 1,32**
СОЭ, мм/час	11,5 ± 9,74	4,2 ± 1,78

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

Таблица 4

КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ЛАБОРАТОРНЫМИ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ДАННЫМИ И ПОКАЗАТЕЛЯМИ ИГХ-ИССЛЕДОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ ХГС С 1b И 3a ГЕНОТИПАМИ HCV				
	Количество NS3Ag-инфицированных гепатоцитов		Среднее число вирусных протеинов (NS3Ag) в гепатоците	
	1b генотип	3a генотип	1b генотип	3a генотип
Общий билирубин	0,9*	0,6*	0,9*	0,25
Прямой билирубин	0,8*	0,3	0,8*	0,2
γ-глобулин	0,8*	0,1	0,4	-0,5
СОЭ	0,4	0,87*	0,8*	0,33
ГД	0,17	0,54*	0,07	0,82*
МКД	0,4	0,71*	0,1	0,48*

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



у больных группы № 2 –  $11,22 \pm 10,31$  против  $5,37 \pm 1,94$  ( $p > 0,05$ ) в группе № 1. Уровень ККЖД и МКЖД был невысоким в обеих группах и не имел достоверных отличий (табл. 3). Выраженность ГД была больше у больных группы с 3а генотипом, однако уровни ВИ, ПИ, ППИ, ЦИ, ВФ, ЦФ и ККД были достоверно более высоким у пациентов с 1в генотипом (табл. 3).

Значимой разницы в лабораторных показателях ХГС при 1в и 3а генотипах выявлено не было, за исключением большего числа лейкоцитов и лимфоцитов периферической крови при 3а генотипе (табл. 3).

Уровень NS3Ag (КИГ и ЧВПГ) при 1в генотипе не коррелировал с гистологическими показателями, но был прямо связан с некоторыми лабораторными тестами: с уровнем общего билирубина —  $r = 0,9$  ( $p < 0,05$ ),  $r = 0,9$  ( $p < 0,05$ ); с уровнем прямого билирубина —  $r = 0,8$  ( $p < 0,05$ ),  $r = 0,8$  ( $p < 0,05$ ); с уровнем  $\gamma$ -глобулинов —  $r = 0,8$  ( $p < 0,05$ ),  $r = 0,4$  ( $p > 0,05$ ); с уровнем СОЭ —  $r = 0,4$  ( $p > 0,05$ ),  $r = 0,8$  ( $p < 0,05$ ) соответственно (табл. 4).

При 3а генотипе, напротив, отмечалась позитивная корреляция между уровнем NS3Ag (ЧВПГ) и некоторыми гистологическими показателями: числом клеток в состоянии ГД —  $r = 0,82$  ( $p < 0,05$ ) и МКД —  $r = 0,48$  ( $p < 0,05$ ), и не выявлялось корреляции с лабораторными тестами (табл. 4). КИГ при 3а генотипе тесно коррелировало с уровнем ГД —  $r = 0,54$  ( $p < 0,05$ ), МКД —  $r = 0,71$  ( $p < 0,05$ ), общего билирубина —  $r = 0,6$  ( $p < 0,05$ ) и СОЭ —  $r = 0,87$  ( $p < 0,05$ ).

Не выявлялись связи между уровнем NS3Ag и уровнем виремии при различных генотипах HCV. Коэффициент корреляции между данными показателями составил —  $r = -0,22$  ( $p > 0,05$ ) при 1в генотипе,  $r = -0,1$  ( $p > 0,05$ ) — при 3а генотипе.

В проведенном исследовании количество NS3Ag-положительных гепатоцитов у пациентов с ХГС составила в среднем  $45,41 \pm 33,43\%$ , и оно прямо зависело от концентрации NS3Ag в гепатоцитах —  $r = 0,56$  ( $p < 0,01$ ). Цитоплазматическая локализация NS3Ag преобладала над ядерной, что совпадает с данными других исследователей [6, 14]. Так количество гепатоцитов с внутриядерными включениями NS3Ag в нашем исследовании составило всего  $1,76 \pm 0,89\%$ . Присутствие данного неструктурного белка в ядрах гепатоцитов может способствовать персистенции HCV-инфекции [14]. Накопление NS3Ag в ядре, по мнению W. Errington с соавт. (1999) [14], происходит через ассоциацию с клеточным белком p53, подавляющим опухолевый рост клетки. S. Ishido с соавт. (1997) [20] установили, что данная связь не только обеспечивает вход NS3Ag в ядро гепатоцита, но и влияет на внутриядерную концентрацию p53, снижая способность печеночной клетки подвергаться апоптозу, тем самым поддерживая вирусную персистенцию.

В целом, в группе пациентов с ХГС концентрация NS3Ag не была связана с большинством лабораторных показателей активности, с гистологическими параметрами воспаления и фиброза, но определяла

выраженность паренхиматозного повреждения и мелкоклеточной дисплазии гепатоцитов, что подтверждает непосредственное повреждающее действие вируса на гепатоциты, а также свидетельствует о проонкогенном эффекте NS3Ag.

Отсутствие параллелизма между уровнем NS3Ag и уровнем виремии можно объяснить тем, что NS3Ag относится к неструктурным белкам HCV и несет в большей степени функциональную нагрузку.

У обследованных больных выявлялось 2 типа преимущественного распределения NS3Ag в цитоплазме гепатоцитов: равномерно диффузное и периферическое/околочелюстчатое. Тип распределения NS3Ag не зависел от генотипа HCV, но определял выраженность деструктивно-воспалительного процесса в печени. У пациентов с преимущественной периферической локализацией NS3Ag в цитоплазме гепатоцитов отмечались более высокие лабораторные и гистологические показатели НВС, что, вероятно, было обусловлено активной презентацией NS3Ag на мембране и иммунным цитолизом печеночных клеток.

При ХГС с 1в генотипом по сравнению с 3а генотипом в большей степени были выражены показатели воспаления и фиброза во всех зонах ацинуса, несмотря на более низкую концентрацию NS3Ag в ткани печени, что свидетельствует о более выраженном иммуноопосредованном действии 1в генотипа HCV и о более тяжелом течении заболевания при нем. На это же указывали положительные корреляционные связи между концентрацией NS3Ag в гепатоцитах и уровнями общего, прямого билирубина,  $\gamma$ -глобулинов и СОЭ.

3а генотип HCV обладал более выраженным цитопатическим эффектом: уровень ГД у пациентов данной группы превысил таковой у пациентов с 1в генотипом в 3,26 раза ( $p < 0,05$ ), и между концентрацией NS3Ag и ГД при 3а генотипе существовала прямая позитивная связь ( $r = 0,82$ ,  $p < 0,05$ ) в отличие от 1в генотипа ( $r = 0,01$ ,  $p > 0,05$ ).

Что касается дисплазии гепатоцитов, то МКД выявлялась значительно чаще, чем ККД, не зависела от генотипа вируса и прямо коррелировала с уровнем NS3Ag в гепатоцитах. ККД, не зависела от уровня NS3Ag и была более выраженной при 1в генотипе HCV у больных более старшего возраста и с более длительными сроками инфицирования. Мнения исследователей о значении вида дисплазии в онкогенезе расходятся. P. P. Anthony (1973) [18] считает, что ККД является предшественницей ГЦК, а A. Henmi с соавт. (1985) [21] связывают ее генез со старением печеночных клеток. Учитывая существующую в литературе информацию о канцерогенном влиянии NS3Ag, а также выявленную частую МКД, которая коррелировала с уровнем NS3 у обследованных больных ХГС, можно предположить более значимую роль в канцерогенезе МКД гепатоцитов.

## ВЫВОДЫ

1. У больных ХГС определялась цитоплазматическая экспрессия NS3Ag двух типов: диффузная равномерная и периферическая/окололемебранная. Ядерная экспрессия NS3Ag была редкой и слабо выраженной.

2. Топография NS3Ag в гепатоцитах влияла на активность гепатита: при периферической/окололемебранной локализации NS3Ag отмечались более высокие лабораторные и гистологические показатели некротически-воспалительного синдрома.

3. Уровень NS3Ag не коррелировал с активностью аминотрансфераз, уровнем виремии и гистологическими показателями воспаления и фиброза, но от него прямо зависела выраженность

крупнокапельной жировой и гидропической дистрофии и мелкоклеточной дисплазии гепатоцитов, свидетельствуя о цитопатическом и проонкогенном действии данного белка.

4. Топография NS3Ag не зависела от генотипа вируса, а его уровень был выше при 3а генотипе, чем при 1b генотипе HCV.

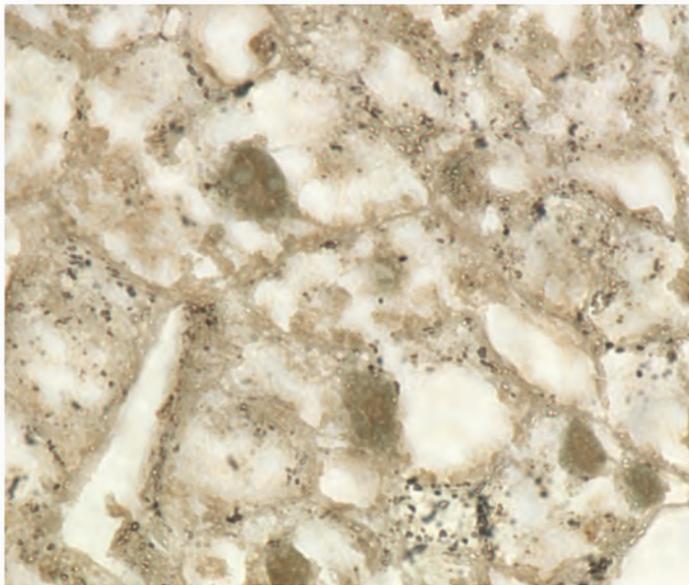
5. При 3а генотипе HCV отмечался достоверно более высокий уровень гидропической дистрофии гепатоцитов, а при 1b генотипе — воспалительной лимфоцитарной инфильтрации и фиброза во всех зонах ацинуса, подтверждая больший цитопатический эффект 3а генотипа и иммуноопосредованный эффект 1b генотипа HCV.

## ЛИТЕРАТУРА

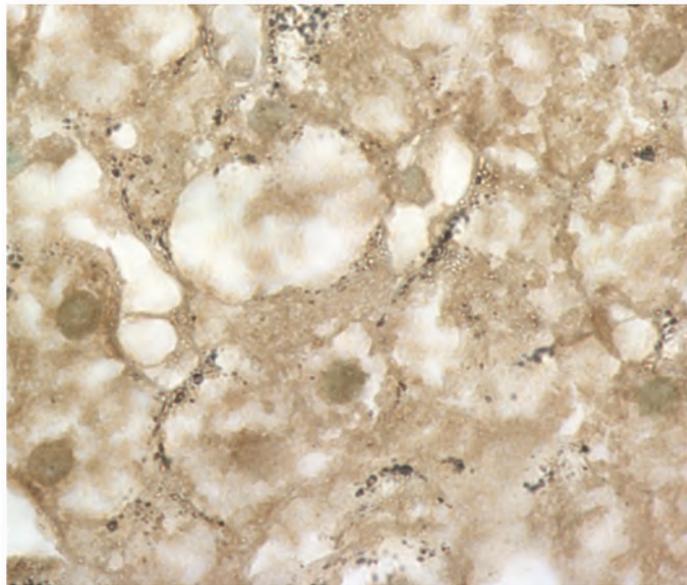
1. Непомнящих Г. И., Айдагулова С. В., Непомнящих Д. Л. и др. Иммуногистохимическое, молекулярно-биологическое и патоморфологическое исследование биоптатов печени при хроническом гепатите С // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2002. — № 134 (9). — С. 356–360.
2. Kasprzak A., Adamek A., Przybyszewska W. et al. p21/Waf1/Cip1 cellular expression in chronic long-lasting hepatitis C: correlation with HCV proteins (C, NS3, NS5A), other cell-cycle related proteins and selected clinical data // Folia Histochemica et Cytobiologica. — 2009. — 47 (3): 385–394.
3. Непомнящих Г. И., Айдагулова С. В., Непомнящих Д. Л. и др. Морфогенез хронического гепатита С и цирроза печени инфекционно-вирусного генеза // Бюллетень СО РАМН. — 2008. — № 134 (6). — С. 66–77.
4. Покровский В. И., Непомнящих Г. И., Толоконская Н. П. Хронический гепатит С: современные представления о пато- и морфогенезе. Концепция антивирусной стратегии гепатоцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2003. — 135 (4). С. 364–376.
5. Masalova O. V., Abdulmedzhidova A. G., Shkurko T. V. et al. Analysis of hepatitis C virus proteins in hepatic cells of patients with chronic hepatitis C // Vopr. Virusol. — 2003. — 48 (1): 9–14.
6. Kasprzak A., Seidel J., Biczysko W. et al. Intracellular localization of NS3 and C proteins in chronic hepatitis C // Liver Int. — 2005. — 25 (4): 896–903.
7. Дуданова О. П., Яхонтова О. И., Нагорнев В. А. и др. Значение иммуногистохимического метода исследования в диагностике хронического гепатита В и С // Медицинский академический журнал. — 2005. — № 5 (4). — С. 93–99.
8. Liao W. H., Tung Sh. Y., Shen Ch. H. et al. Tissue expression of the hepatitis C virus NS3 protein does not correlate with histological or clinical features in patients with chronic hepatitis C // Chang Gung Med. J. — 2011. — 34 (3): 260–267.
9. Макарова О. В., Каниболоцкий А. А., Лунькова Л. К. Морфологические особенности хронического вирусного гепатита С у наркоманов // Архив патологии — 2008. — 70 (6): 25–30.
10. Bahnassi A. A., El-Houssini S., Mokhtar N. M. et al. Correlation between HCV-NS3p, p21waf, MDM2, p21RAS, and c-ErbB2 in HCV associated hepatocellular carcinoma and adjacent pericarcinomatous foci // J. Egypt Nat. Cancer Inst. — 2002. — 14: 75–85.
11. Непомнящих Г. И., Толоконская Н. П., Айдагулова С. В. и др. Является ли репликация вируса гепатита С маркером степени активности инфекционного процесса? По данным полимеразной цепной реакции и морфологического анализа биопсий печени // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2003. — № 135 (3). — С. 343–348.
12. Kasprzak A., Adamek A., Biczysko W. et al. Intracellular expression of the proliferative marker Ki-67 and viral proteins (NS3, NS5A and C) in chronic, long lasting hepatitis C virus (HCV) infection // Folia Histochem Cytobiol. — 2007. — 45: 357–366.
13. Nayak N. C., Sathar S. A. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus antigen in paraffin embedded liver biopsies from patients with chronic liver disease // Acta Histochem. — 1999. — 101 (4): 409–419.
14. Errington W., Wardell A. D., McDonald S. et al. Subcellular localisation of NS3 in HCV-infected hepatocytes // J. Med. Virol. — 1999. — 59 (4): 456–462.
15. Чирский В. С., Жданов К. В., Гусев Д. А. и др. Морфологическая характеристика HCV-цирроза печени // Архив патологии. — 2009. — № 71 (7). С. 29–32.
16. Дуданова О. П. (ред.) Диагностика хронических гепатитов: учебное пособие. — Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2010. — 128 с.
17. Blaight K., Rowland R., Hall P. et al. Immunohistochemical detection of the NS4 antigen of hepatitis C virus and its relation to histopathology // Am. J. Pathol. — 1993. — 143: 1568–1573.
18. Anthony P. P., Vogel C. L., Barker L. F. Liver cell dysplasia: a premalignant condition // J. Clin. Pathol. — 1973. — 26: 217–223.
19. Watanabe S., Okita K., Harada T. et al. Morphologic studies of the liver cell dysplasia // Cancer. — 1983. — 51: 2197–2205.
20. Ishido S., Muramatsu S., Fujita et al. Wild-type but not mutant-type p53 enhances nuclear accumulation of NS3 protein of hepatitis C virus // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1997. — 230: 431–436.
21. Henmi A., Uchida T., Shikata T. Karyometric analysis of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma // Cancer. — 1985. — 55: 2594–2599.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ

**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ NS3Ag ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ С:  
СВЯЗЬ С КЛИНИКО-ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ И ГЕНОТИПАМИ HCV**



**Рис. 1.** Цитоплазматическая равномерная диффузная локализация NS3Ag в гепатоцитах (увеличение x500).



**Рис. 2.** Цитоплазматическая периферическая/околомембранная локализация NS3Ag в гепатоцитах (увеличение x500).