

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПАХ HCV-ИНФЕКЦИИ

Пьянников В. В.¹, Ахмедов В. А.², Горчаков В. В.², Васькина Т. В.³

¹ Городская поликлиника № 3, Омск

² Омская государственная медицинская академия

³ Клинический диагностический центр, Омск

Ахмедов Вадим Адильевич

644042, Омск, просп. Маркса, д. 37, кв. 126

Тел.: 8 (3812) 31-96-97

E-mail: v_akhmedov@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Оценить особенности иммунного ответа пациентов с различными генотипами HCV, проживающих на Юге западной Сибири — в Омской области. **Материалы.** Под наблюдением находилось 130 пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС). Из них мужчин — 95, женщин — 35. **Результаты.** На территории Юга Западной Сибири — Омска и Омской области генотипы 1 и 3 HCV встречаются с одинаковой частотой и являются наиболее распространенными у больных ХВГС более молодого возраста, при этом у пациентов с генотипом 1 HCV доминирует подтип вируса 1b. У пациентов, инфицированных генотипами 1 и 3 HCV, отмечается более выраженный системный воспалительный ответ, приводящий к массивным воспалительно-некротическим изменениям в паренхиме печени, с последующим повреждением гепатоцитов за счет межклеточных взаимодействий клеток иммунной системы и цитокинов, и, соответственно, ведущий к развитию цирроза печени в более раннем возрасте.

SUMMARY

The aim of the study was to investigate the features of immune response in patients with HCV infection on the South of Western Siberia. **Materials.** The 130 patients with different genotypes of HCV infection were investigated (95 men and 35 women). **Results.** On the territory of the South of Western Siberia the 1 and 3 genotypes of HCV infection were present especially in young men and women and 1b subtype was dominated. In patients with 1 and 3 genotypes of HCV infection was occurred the massive inflammatory response with intensive necrotic proinflammatory cytokines damages of the liver tissue and high cirrotic occurring in young age.

В Российской Федерации (РФ) наиболее распространенным является генотип 1b, далее с убывающей частотой — 3a, 1a и 2a вируса гепатита С (HCV) [1; 3]. Однако большинство работ, представленных для изучения распространения HCV на территории РФ, затрагивали ее европейскую часть, более того, при исследовании в разных регионах данные у различных исследователей отличались между собой. Поэтому в связи с недостаточной изученностью распространенности различных генотипов HCV в Западной Сибири, а также в связи с противоречивостью данных в зависимости от местности изучение генотипов HCV, циркулирующих на юге Западной Сибири — в Омской области, позволило бы расширить представление о клинических

проявлениях и эпидемиологическом прогнозе в плане формирования тяжелых форм поражения печени.

Цель исследования — оценить особенности иммунного ответа пациентов с различными генотипами HCV, проживающих на юге Западной Сибири — в Омской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением находилось 130 пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС). Из них мужчин — 95, женщин — 35. Средний возраст составил $32,58 \pm 0,86$ года (от 15 до 70 лет). Среди больных в анамнезе употребление наркотиков было у 18 (14,46%), операции, гемотрансфузии и прочие

вмешательства — у 17 (13,08%), наличие факторов риска не установлено у 95 человек (73,08%). Генотип 1 был выявлен у 59 пациентов (45,38%), генотип 2 — у 9 пациентов (6,92%), генотип 3 обнаруживался у 62 пациентов (47,69%). Сочетание генотипов 1 и 3 было представлено в 5 случаях (3,85%). Среди пациентов с генотипом 1 подтип 1a встречался в 12 случаях (9,23%), подтип 1b — в 47 случаях (36,15%). Средний возраст больных ХГС с поражением генотипом 1 вируса составил $33,04 \pm 1,4$ года, с генотипом 2 — $45,11 \pm 5,64$ года, с генотипом 3 — $30,48 \pm 0,75$ года. Среди больных ХВГС с генотипами 1 и 3 было по 2 человека в каждой группе с впервые выявленным циррозом печени.

До момента исследования больные не получали стандартных схем этиотропной противовирусной терапии. У всех пациентов изучали в динамике клиническое течение заболевания, изменения общих анализов крови и мочи, проводили биохимические исследования крови: определяли уровень общего белка, активность аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), общего холестерина, концентрацию общего, прямого и непрямого билирубина, тимоловую пробу. Инструментальные методы диагностики включали в себя ультразвуковое исследование органов брюшной полости (УЗИ)

и эзофагогастродуоденоскопию (ФГДС) (для исключения выраженной патологии желудка и двенадцатиперстной кишки).

Диагноз хронического вирусного гепатита основывался на наличии клинико-инструментальных признаков гепатомегалии и спленомегалии (верифицировались по данным УЗИ) и наличии по данным УЗИ диффузных изменений в паренхиме печени. Также всем больным проводилось для верификации диагноза исследование маркеров вирусной инфекции: HCV (aHCV, aHCVIgM, aHCVcoreNS) и HBV (HBsAg, aHBcor, aHBcorIgM, HBeAg, aHBe). У всех больных была исключена сопутствующая инфекция вирусом гепатита В. Кроме того, всем больным проводилось ПЦР с генотипированием и из них 68 пациентам — с определением вирусной нагрузки. Для определения генотипа и вирусной нагрузки использовались коммерческие тест-системы «АмплиСенс — HCV-генотип» и «АмплиСенс — HCV-Монитор» соответственно производства фирмы ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, Москва.

Нами также были изучено содержание CD3, CD4, CD8 (ЦТЛ), CD16, CD95 (использовались коммерческие тест-системы производства фирмы ООО «Сорбент», Россия, Москва), TNF-а, интерлейкина-4 (IL-4) (использовались коммерческие тест-системы производства фирмы ЗАО «ВекторБест», Россия,

Таблица 1

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В СРАВНИВАЕМЫХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ				
Показатели	Генотип 1	Генотип 2	Генотип 3	Норма
Общий билирубин (мкмоль/л)	$15,01 \pm 3,2$	$7,87 \pm 1,44$	$16,15 \pm 2,2$	8,5 – 20,5
АлАТ (ед/л)	$57,03 \pm 11,43$	$62,62 \pm 11,6$	$124,72 \pm 11,72$	8 – 54
АсАТ (ед/л)	$34,03 \pm 5,75$	$35,3 \pm 4,23$	$54,18 \pm 4,84$	16 – 40
ЩФ (ед/л)	$190,3 \pm 29,42$	$193,74 \pm 24,77$	$187,95 \pm 20,35$	0 – 315
ГГТП (ед/л)	$49,7 \pm 20,11$	$33,17 \pm 10,95$	$40,07 \pm 12,46$	0 – 45
Глюкоза (ммоль/л)	$4,29 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,64$	$4,44 \pm 0,13$	3,3 – 5,5
Общий белок (г/л)	$78,34 \pm 2,85$	$76,8 \pm 0,82$	$77,07 \pm 1,86$	65 – 85
Тимоловая проба (ед)	$4,86 \pm 1,43$	$7,18 \pm 1,65$	$3,17 \pm 0,47$	1 – 4
Холестерин (ммоль/л)	$4,38 \pm 0,19$	$4,64 \pm 0,21$	$4,52 \pm 0,32$	3,7 – 7,0
Нагрузка (млн копий/мл)	$1,66 \pm 0,35$	$2,69 \pm 0,33$	$1,78 \pm 0,41$	—
Больные с ЦП (человек)	2	—	2	

Новосибирск), а также содержание ИФН- α и ИФН- γ , как спонтанного, так и стимулированного (использовались коммерческие тест-системы производства фирмы ЗАО «ВекторБест», Россия, Новосибирск).

Достоверность различий средних значений оценивали по критерию t Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Все расчеты выполнены на персональном компьютере с использованием программы SPSS v. 11.5.0 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам общеклинических методов исследования были получены следующие данные (табл. 1). При генотипе 2 HCV содержание билирубина у пациентов было достоверно ниже в сравнении с генотипами 1 и 3 ($p < 0,05$), между которыми в отношении этого показателя достоверных различий получено не было.

При отсутствии достоверных различий между генотипами 1 и 2 HCV цитолиз при генотипе 3 вируса был достоверно выше, чем в двух других группах ($p < 0,01$ для показателей АлАТ и $p < 0,05$ для показателей АсАТ). Содержание глюкозы и общего белка у больных всех групп не показало достоверных различий, что указывало на компенсированную функцию печени у большинства исследуемых пациентов.

Совершенно неожиданными оказались результаты показателей тимоловой пробы, которые были достоверно более высокими у больных с генотипом

2 HCV в сравнении с больными с генотипом 3 HCV ($p < 0,05$). Хотя достоверные различия были получены только между группами пациентов с двумя данными генотипами, следует отметить, что сравнение показателя не выявило достоверных различий у больных ХВГС с генотипами 1 и 3. В отношении сравнения показателей данной флокуляционной пробы у больных ХВГС, инфицированных 1 и 2 генотипами HCV, была выявлена явная тенденция к более высоким показателям тимоловой пробы у больных ХВГС с генотипом 2 HCV. Данный феномен может свидетельствовать, на наш взгляд, только о нарушении белково-синтетической функции печени, ставя под сомнение наличие «более благоприятного клинического течения» при некоторых генотипах вируса [11].

При исследовании других молекулярно-биологических особенностей вируса HCV было установлено, что у больных с генотипом 1 HCV вирусная нагрузка была достоверно ниже в сравнении с пациентами, инфицированными генотипом 2 HCV ($p < 0,05$). Причем вирусная нагрузка у пациентов с генотипом 2 HCV была самой высокой среди всех групп сравнения. Но если различия с группой больных, пораженных генотипом 1 HCV и генотипом 2, были достоверными, то между группами с генотипами 2 и 3 они не являлись достоверными ($p > 0,05$). Различий в выраженности вирусной нагрузки между генотипами

Таблица 2

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В СРАВНИВАЕМЫХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ				
Показатели	Генотип 1	Генотип 2	Генотип 3	Норма
CD3	74,34 $\pm$ 1,37	70,12 $\pm$ 1,87	76,4 $\pm$ 1,03	65 – 85%
CD4	61,25 $\pm$ 1,73	61,94 $\pm$ 4,79	62,46 $\pm$ 2,08	36 – 64%
CD8	47,73 $\pm$ 1,5	42,5 $\pm$ 1,67	56,29 $\pm$ 1,98	15 – 40%
CD16	8,43 $\pm$ 0,51	8,55 $\pm$ 0,49	9,00 $\pm$ 0,66	6 – 18%
CD95	22,5 $\pm$ 1,94	22,67 $\pm$ 4,18	20 $\pm$ 3,94	17 – 30%
Интерферон-альфа (сыворотка крови)	5,53 $\pm$ 0,76	18,93 $\pm$ 3,95	9,51 $\pm$ 2,28	0 – 45 пг/мл
Интерферон-гамма (спонтанный)	28,51 $\pm$ 2,66	23,6 $\pm$ 2,51	44,91 $\pm$ 3,37	0 – 50 пг/мл
Интерферон-гамма (стимулированный)	868,43 $\pm$ 174,16	1123,63 $\pm$ 273,03	1408,76 $\pm$ 235,68	250 – 3000 пг/мл
TNF- α	4,25 $\pm$ 0,56	2,7 $\pm$ 0,58	2,36 $\pm$ 0,69	0,00 – 2,50 пг/мл
IL-4	5,64 $\pm$ 0,22	6,47 $\pm$ 0,24	5,84 $\pm$ 0,27	0,00 – 13,0 пг/мл

1 и 3 HCV практически не наблюдалось, как, впрочем, и различий в частоте цирроза печени на фоне детерминированного ими ХВГС.

Изучение иммунологических показателей выявило целый ряд особенностей, по-видимому, отражающих патогенетические различия, ассоциированные с различными генотипами HCV (табл. 2).

Во-первых, при генотипе 2 HCV в крови больных обнаруживалось достоверно меньшее количество CD3-клеток, нежели при генотипе 3 ($p < 0,05$). При анализе различий в количестве CD3-клеток опять проявился феномен своеобразной «исключительности» генотипа 2 HCV. Количество CD3-клеток при достоверности различий в содержании у больных генотипами 2 и 3 таковой достоверности различий между генотипами 1 и 2 не продемонстрировало. Различия между пациентами, инфицированными генотипами 1 и 3 HCV, были крайне незначительными.

Достоверных различий в содержании CD4-клеток между всеми группами сравнения обнаружено не было ($p > 0,05$). На наш взгляд, этот факт имеет следующее объяснение. По современным представлениям, сильный CD4⁺ Т-клеточный пролиферативный ответ на антигены HCV характерен для больных острым вирусным гепатитом С с самоограничением инфекционного процесса, а не для ХВГС [5; 7]. У больных ХВГС иммунная система не способна организовать ответ, ограничивающий инфекционный процесс. Следовательно, каких-либо достоверных отличий быть не может в связи с тем, что практически все они инфицированы ХВГС.

Вторым интересным фактом, обнаруженным при изучении иммунологических показателей у пациентов с различными генотипами HCV, было достоверно различное количество CD8⁺-клеток во всех группах сравнения. Причем содержание CD8⁺-клеток при генотипе 3 HCV было достоверно выше, чем при генотипе 1 ($p < 0,01$) и при генотипе 2 ($p < 0,01$). Различия между содержанием данных субпопуляций лимфоцитов были также достоверными при сравнении групп пациентов с генотипами 1 и 2 HCV ($p < 0,05$). В группе больных ХВГС, инфицированных генотипом 1 вируса, содержание CD8⁺-клеток было достоверно выше. Таким образом, вышеприведенные данные еще раз подтверждают более неблагоприятное течение ХВГС, вызванного генотипами 1 и 3 HCV [13].

Изучение содержания CD16 и CD95 не выявило достоверных различий между группами сравнения. Данный факт, вероятно, отражает неспособность иммунной системы обеспечить протективный иммунный ответ при ХВГС [9].

Изучение содержания цитокинов у больных ХВГС с различными генотипами HCV позволило получить следующие результаты. Содержание TNF-α у пациентов, инфицированных генотипом 1 HCV, было достоверно выше в сравнении с инфицированными генотипом 3 HCV ($p < 0,05$) и выше, чем у лиц,

пораженных генотипом 2 HCV. Хотя в последнем случае различия не были достоверными ($p = 0,0543$). Таким образом, при генотипе 1 HCV сывороточный уровень TNF-α у пациентов с ХВГС значительно более высокий.

Подобные результаты были также получены при изучении содержания ИФН-γ в сыворотке больных ХВГС, пораженных различными генотипами HCV. Содержание ИФН-γ у пациентов с генотипами 1 и 3 HCV было выше в сравнении с пациентами с генотипом 2 HCV, в особенности в сравнении с группой пациентов с генотипом 3 HCV ($p < 0,05$).

В то же время содержание в сыворотке крови ИФН-α и IL-4 у группы пациентов, инфицированных генотипом 2 HCV, было достоверно выше в сравнении с группами пациентов, инфицированных генотипами 1 и 3 HCV, что может косвенно свидетельствовать о более адекватной регуляции Т-клеточного ответа при данном генотипе вируса [15] и иметь значение в оценке эффективности противовирусной терапии, определяя лучший ответ на проводимое лечение [18].

По современным представлениям, наиболее существенным механизмом гибели инфицированных HCV гепатоцитов является апоптоз вследствие клеточного иммунного ответа, в особенности опосредованного цитотоксическими Т-клетками (ЦТЛ). Ряд исследований подтверждает ведущую роль последних не только в клиренсе вируса, но и в патогенезе повреждения печени при вирусных гепатитах [10; 17]. ЦТЛ вызывают апоптоз инфицированных клеток с помощью перфорин-гранзимового комплекса и через систему Fas/FasL в результате взаимодействия растворимого или экспрессированного на поверхности активированных лимфоцитов FasL с Fas-рецептором клеток-мишеней, а также нарушают репликацию вируса и экспрессию вирусных белков в инфицированной клетке благодаря секреции ряда цитокинов, в частности ИФН-γ и TNF-α [4]. Более высокие уровни ИФН-γ и TNF-α у больных ХВГС определяют ведущую роль этих цитокинов в патогенезе системного воспалительного ответа при данном заболевании [14].

О важной роли ЦТЛ в повреждении гепатоцитов при ХВГС свидетельствуют следующие факты. Гистологически при гепатите в портальных трактах и внутри печеночных долек отмечается лимфоцитарный инфильтрат, обогащенный CD8⁺ Т-клетками [6]. Помимо вышеуказанного в печени пациентов с ХВГС в зонах активного воспаления часто обнаруживаются активированные лимфоциты, экспрессирующие FasL [8; 12], а гепатоциты проявляют повышенную экспрессию Fas [16].

Таким образом, повышенное содержание ИФН-γ, TNF-α и CD8⁺ Т-клеток у пациентов с ХВГС, вызванным генотипами 1 и 3 HCV, и значительно более выраженный цитолиз у пациентов с генотипом 3 HCV позволяют утверждать, что при данных генотипах вируса имеют место более выраженные воспалительно-некротические воспаления

в паренхиме печени, детерминированные системным воспалительным ответом, направленным на элиминацию возбудителя. Более выраженные воспалительно-некротические изменения у пациентов, инфицированных генотипами 1 и 3 вируса HCV, приводят к развитию цирроза чаще, несмотря на более молодой возраст больных, пораженных данными генотипами.

ВЫВОДЫ

1. На территории юга Западной Сибири — Омска и Омской области генотипы 1 и 3 HCV встречаются с одинаковой частотой и являются наиболее рас-

пространенными у больных ХВГС более молодого возраста.

2. У пациентов с генотипом 1 HCV доминирует подтип вируса 1b.

3. У лиц, инфицированных генотипами 1 и 3 HCV, отмечается более выраженный системный воспалительный ответ, приводящий к массивным воспалительно-некротическим изменениям в паренхиме печени с последующим повреждением гепатоцитов за счет межклеточных взаимодействий клеток иммунной системы и цитокинов, ведущих к развитию цирроза печени в более раннем возрасте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жданов К. В. Латентные формы вирусных гепатитов В и С у лиц молодого возраста: автореф. дис. докт. мед. наук. — СПб., 2000. — 37 с.
2. Майер К. П. Гепатит и последствия гепатита: практ. руководство: пер. с нем. — 2-е изд., перераб и доп. — М.: ГЭОТАР-Мед, 2004. — 720 с.
3. Ястребова О. Н. Гепатит С. Информационно-методическое пособие. — Кольцово, 2000.
4. Berke G. Killing mechanisms of cytotoxic lymphocytes // Curr. Opin. Hematol. — 1997. — Vol. 4. — P. 32–40.
5. Cramp M. E., Carucci P., Rossol S. et al. Hepatitis C virus (HCV) specific immune response in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia // Gut. — 1999. — Vol. 44. — P. 424–429.
6. Crawford J. M. The liver and the biliary tract // Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th ed. // Cortran. — 1999. — P. 857–868.
7. Gerlach J. T., Diepolder H. M., Jung M. K. et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4⁺ T cell response in acute hepatitis C // Gastroenterology. — 1999. — Vol. 117. — P. 933–941.
8. Hayashi N., Mita E. Fas system and apoptosis in viral hepatitis // J. Gastroenterol. Hepatol. — 1997. — Vol. 12. — P. 223–226.
9. Kirman I., Vainer B., Nielsen O. H. Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases // Inflamm. Res. — 1998. — Vol. 47. — P. 285–289.
10. Koziel M. J. The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection // J. Viral. Hepat. — 1997. — Vol. 4, Suppl. 2. — P. 31–41.
11. Martinot-Peignoux M., Marcellin P., Pouteauet M. et al. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon-alfa therapy in chronic hepatitis C // Hepatology. — 1995. — Vol. 22. — P. 1050–1056.
12. Mita E., Hayashi N., Lio S. et al. Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C infection // Biochim. Biophys. Res. Commun. — 1994. — Vol. 204. — P. 468–474.
13. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement, Management of hepatitis C/Hepatology. — 2002. — Vol. 36. — P. 3–20.
14. Nelson D. R., Lau J. Y. Host immune response in hepatitis C virus infection // Viral. Hepat. — 1996. — Vol. 2. — P. 37–48.
15. Nelson D. R., Lim H. L., Marousis C. G. et al. Activation of tumor necrosis factor- α system in chronic hepatitis C virus infection // Dig. Dis. Sci. — 1997. — Vol. 42. — P. 2487–2494.
16. Ohishi M., Sakisaka S., Koji T. et al. The localization of HCV and the expression of Fas antigen in the liver of HCV-related chronic liver disease // Acta Histochem. Cytochem. — 1995. — Vol. 28. — P. 341–348.
17. Rehmann B., Lau D., Hoofangle J. H. et al. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection // J. Clin. Invest. — 1996. — Vol. 97. — P. 1655–1665.
18. Zeuzem S., Hultcrantz R., Bourliere M. et al. Peg-interferon alfa-2b 1.5g/kg plus ribavirin 800–1400 mg/day for 24 weeks in patients with HCV 2 or 3 // Hepatology. — 2003. — Vol. 38. — P. 347.

