

ностью резистентных к лечению ИФН, геном HCV субтипа 1b только в 25% случаев не имеет мутаций в ISDR-регионе (т. е. выявлен "дикий" вариант) и в 75% случаев представляет собой промежуточный тип изменчивости (1—3 замены), а наиболее частой мутацией является наличие замен в позиции 2218 (гистидин/аргинин). Данные результаты частично согласуются с результатами, полученными как на японской, так и на европейской популяции, так как у пациентов Московского региона, резистентных к ИФН, не выявляется выраженная мутационная изменчивость ISDR, как и в японской популяции, однако преобладает промежуточный тип изменчивости, что характерно для европейской популяции. Полученные данные также демонстрируют, что результаты секвенс-анализа ISDR, проведенного до лечения, возможно, позволяют предсказывать эффективность терапии ИФН- $\alpha_2$  у конкретного пациента с HCV-инфекцией, однако необходимы широкомасштабные исследования (подобные японским) для выявления мутаций, определяющих резистентность к ИФН- $\alpha_2$ , у больных, проживающих на территории РФ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Choo Q. L., Kuo G., Weiner A. J. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359—362.
2. Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 1997; 78: 2397—2410.
3. Purcell R. The hepatitis C virus: overview. *Hepatology* 1997; 26 (3, suppl. 1): 134—143.
4. Farci P. Hepatitis C virus. The importance of viral heterogeneity. *Clin. Liver Dis.* 2001; 5 (4): 895—916.
5. Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y. et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid

- substitutions in the NS5A gene. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 224—230.
6. Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y. et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334 (2): 77—81.
7. Kurosaki M., Enomoto N., Murakami T. et al. Analysis of genotypes and amino acid residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon-beta therapy. *Hepatology* 1997; 25 (3): 750—753.
8. Khorsi H., Castelain S., Wyseur A. et al. Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209—2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon-alfa therapy in French patients. *J. Hepatol.* 1997; 27: 72—77.
9. McKechnie V. M., Mills P. R., McCrudden E. A. The NS5a gene of hepatitis C virus in patients treated with interferon-alpha. *J. Med. Virol.* 2000; 60 (4): 367—378.
10. Pawlotsky J. M., Germanidis G., Neumann A. U. et al. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: Relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* 1998; 72: 2795—2805.
11. Saiz J. C., Lopez Labrador F. X. et al. The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* 1998; 177: 839—847.
12. Watanabe H., Enomoto N., Nagayama K. et al. Number and position of mutations in the interferon (IFN) sensitivity-determining region of the gene for nonstructural protein 5A correlate with IFN efficacy in hepatitis C virus genotype 1b infection. *J. Infect. Dis.* 2001; 183: 1195—1203.
13. Wöhlslund A., Hofmann W. P., Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20 (1): 23—38.
14. Zeuzem S., Lee J. H., Roth W. K. Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* 1997; 25: 740—744.
15. Pascu M., Martus P., Höhne M. et al. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut* 2004; 53 (9): 1345—1351.

Поступила 13.10.08

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 616.36-002.2-022:578.891]-078.33-076.5

А. С. Лазарева, Е. В. Волчкова, К. Т. Умбетова, В. П. Чуланов, Ю. Г. Пархоменко, М. В. Киселевский, С. Г. Пак

### ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ В И С В СОПОСТАВЛЕНИИ С ВЫРАЖЕННОСТЬЮ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕЧЕНИ

Федеральное агентство по здравоохранению и социальному развитию, кафедра инфекционных болезней ГОУ ВПО Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова Росздрава

**Цель исследования.** Изучить концентрацию цитокинов в сыворотке крови при спонтанной и стимулированной вирусом Ньюкасла (NDV) и фитогемагглютинином (ФГА) продукции мононуклеарами периферической крови (МНПК) и содержание субпопуляций лимфоцитов периферической крови в сопоставлении с выраженностью морфологических изменений печени у больных хроническими вирусными гепатитами В и С (ХГВ и ХГС).

**Материалы и методы.** Обследованы 37 больных хроническими вирусными гепатитами (13 больных ХГВ и 24 больных ХГС). У всех пациентов изучена концентрация интерферонов  $\alpha$  и  $\gamma$  (ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ),  $\alpha$ -фактора некроза опухоли ( $\alpha$ -ФНО), интерлейкинов (ИЛ) 1 $\beta$ , 4 и 6 в сыворотке крови, при спонтанной и стимулированной NDV и ФГА продукции МНПК, содержание CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, HLA-DR, CD20, CD38 субпопуляций лимфоцитов периферической крови, произведена пункционная биопсия печени по Менгину с последующим определением индекса гистологической активности по R. Knodell, адаптированного в отношении В- и С-гепатитов К. Ishak.

**Результаты.** У больных ХГВ и ХГС уже при минимальной активности процесса и незначительных морфологических изменениях в печени наблюдается достоверное снижение индуциро-

ванной NDV продукции ИФН- $\alpha$ , а у больных с высокой активностью гепатита и с максимально выраженными морфологическими изменениями в печени выявлено достоверное снижение индуцированной NDV продукции ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ,  $\alpha$ -ФНО, ИЛ-6 и индуцированной ФГА продукции  $\alpha$ -ФНО. Только у больных с высокой активностью гепатита и в группе больных с уровнем перипортальных некрозов 5 баллов выявлено статистически значимое снижение иммунорегуляторного индекса, во всех группах больных определена лишь тенденция к его снижению. Несмотря на отсутствие достоверных отличий, во всех группах больных выявлена тенденция к снижению содержания NK-клеток, лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD38<sup>+</sup>. Наиболее выраженные изменения показателей иммунного статуса выявлены при высокой активности процесса в печени, когда наблюдается снижение относительного содержания лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup> и HLADR<sup>+</sup> и иммунорегуляторного индекса. У больных с 4 баллами портального воспаления выявлена тенденция к увеличению количества В-лимфоцитов периферической крови (CD20<sup>+</sup>) и лимфоцитов, экспрессирующих активационные молекулы CD25, CD38, HLADR.

**Заключение.** Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости проведения комплексного обследования больных ХГВ и ХГС, включающее в себя не только определение концентрации цитокинов в сыворотке крови, но и изучение стимулированной NDV и ФГА продукции цитокинов МНПК, с обязательным вычислением показателей иммунорегуляторного индекса для прогноза течения заболевания и подбора адекватной, в том числе противовирусной, терапии.

**Ключевые слова:** хронические вирусные гепатиты В и С, индекс гистологической активности, стимулированная продукция цитокинов, иммунный статус

A.S. Lazareva, E.V. Volchkova, K.T. Umbetova, V.P. Chulanov, Yu.G. Parkhomenko, M.V. Kiselevsky, S.G. Pak

#### CHARACTERISTICS OF THE CYTOKINE PROFILE AND PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS B AND C IN COMPARISON TO SEVERITY OF MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE LIVER

**Aim.** To study cytokine concentration in blood serum in spontaneous and NDV- and PGA stimulated production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and contents of peripheral blood lymphocyte subpopulations when compared with severity of morphological changes of the liver in patients with chronic viral hepatitis B and C (CHB and CHC).

**Material and methods.** A total of 37 patients entered the trial (13 with CHB and 24 with CHC). Concentrations of IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6 in blood serum in spontaneous and NDV and PGA stimulated PBMC production, content of CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, HLADR, CD20, CD38 subpopulations of peripheral blood lymphocytes were examined. Also, puncture biopsy of the liver by Mengini was made with subsequent estimation of the histological activity index by R. Knodell adapted to hepatitis B and C by K. Ishak.

**Results.** Patients with CHB and CHC in minimal activity of the process and insignificant morphological changes in the liver demonstrated a significant fall of NDV induced IFN-alpha production. Patients with highly active hepatitis and maximal morphological changes in the liver had significant lowering of NDV induced production of IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-6 and PGA induced production of TNF-alpha.

**Conclusion.** CHB and CHC patients should be examined not only with estimation of serum cytokines concentration but also NDV and PGA stimulated production of PBMC should be taken into consideration with calculation of immunoregulatory index for prognosis of the disease and choice of adequate therapy.

**Key words:** chronic viral hepatitis B and C, index of histological activity, stimulated cytokine production, immune status

ИЛ — интерлейкин  
ИРИ — иммунорегуляторный индекс  
ИФА — иммуноферментный анализ  
ИФН — интерферон  
МНПК — мононуклеары периферической крови

$\alpha$ -ФНО —  $\alpha$ -фактор некроза опухоли  
ФГА — фитогемагглютинин  
ХГВ — хронический гепатит В  
ХГС — хронический гепатит С

В настоящее время общепризнанным является факт хронизации вирусных гепатитов В и С на фоне нарушения функции иммунокомпетентных клеток. В основе развития иммунопатологических ре-

акций лежит нарушение баланса продукции цитокинов Т-хелперами 1-го и 2-го типов [1—8]. Изучение содержания цитокинов и субпопуляций лимфоцитов периферической крови у больных хроническими вирусными гепатитами В и С (ХГВ и ХГС) является целью работы многих исследователей. Данные, полученные разными авторами, очень разнородны и во многом противоречивы [2, 4, 5, 7, 9—11]. Большинство работ посвящено изучению отдельных вопросов; авторы определяют содержание разных субпопуляций лимфоцитов периферической крови или отдельных цитокинов только в

Для корреспонденции:

Лазарева Анна Светославовна, ассистент кафедры инфекционных болезней ММА им. И. М. Сеченова

Адрес: 105275, Москва, 8-я ул. Соколиной горы, 15

Телефон: 8-495-365-26-11

Факс: 8-495-365-21-07

E-mail: lasareva@rambler.ru

сыворотке крови без определения стимулированной продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови (МНПК) [2, 9, 10, 12] и без сопоставления этих показателей с уровнем гистологической активности и фиброза [3, 10, 13]. В связи с этим целью нашей работы являлось изучение концентрации цитокинов в сыворотке крови, а также спонтанной и стимулированной вирусом Ньюкасла (NDV) и фитогемагглютинином (ФГА) продукции цитокинов МНПК и содержания субпопуляций лимфоцитов периферической крови в сопоставлении с выраженностью морфологических изменений печени у больных ХГВ и ХГС.

### Материалы и методы

Обследованы 37 больных хроническими вирусными гепатитами (13 больных ХГВ и 24 больных ХГС). Исследование проводилось с 2004 по 2007 г. на базе ИКБ № 2 Москвы. В исследование вошли 29 мужчин и 8 женщин в возрасте от 19 до 54 лет, средний возраст 34 года, 90% больных были в возрасте до 40 лет. Забор крови у всех больных проводился однократно. До момента обследования больные не получали противовирусной терапии. Диагноз хронического вирусного гепатита основывался на выявлении синдромов гепато- и спленомегалии, холестаза и цитолиза, данных УЗИ, результатов серологических исследований. У всех больных определяли маркеры вирусных гепатитов в сыворотке крови (anti-HCV IgG, HbsAg, anti-HBcorIgG, anti-HBc-oriG, anti-HAV IgM, anti-HDV IgM, anti-HDVcум.) методом ИФА. С целью подтверждения активной репликации вируса всем больным выполнена полуколичественная ПЦР для выявления HBV-ДНК и HCV-РНК в сыворотке крови с определением генотипа вируса гепатита С. Для оценки цитокинового профиля у больных ХГВ и ХГС изучена концентрация цитокинов (интерфероны — ИФН $\alpha$  и  $\gamma$ ,  $\alpha$ -фактор некроза опухоли —  $\alpha$ -ФНО, интерлейкины — ИЛ — 1 $\beta$ , 4 и 6) в сыворотке крови, а также спонтанная и стимулированная NDV и ФГА продукция данных цитокинов МНПК. Концентрацию цитокинов определяли методом ИФА с использованием наборов реагентов ООО "Протеиновый контур" (Санкт-Петербург). Для изучения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови была определена экспрессия поверхностных маркеров CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, HLADR, CD20, CD38 МНПК при помощи моноклональных антител против соответствующих антигенов ("Caltag Laboratories", США); полученные результаты учитывали методом проточной цитофлюорометрии на проточном цитометре FACScan ("Becton Dickinson", США). Контрольную группу составили 10 здоровых лиц.

Всем больным выполнена пункционная биопсия печени по Менгину с последующим морфологическим исследованием биоптатов печени общепринятым методом полуколичественной оценки гистологической активности и фиброза по R. Knodell, адаптированной в отношении гепатитов В и С К. Ishak. В зависимости от выраженности параметров, характеризующих индекс гистологической активности и фиброз, больные были разделены на группы вне зависимости от этиологии вирусного гепатита.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ Statistica for Windows (2000, версия 6.0; "Statsoft Inc.") и пакета программ Microsoft Excel (2003; "Microsoft"). Гипотезу нормальности распределения во всех выборках проверяли по критерию Колмогорова—Смирнова. В связи с ненормальным распределением первичных данных нами не использованы и не приведены значения средних величин со стандартным отклонением. Центральную тенденцию количественных признаков в группах описывали с использованием медианы, дисперсию признаков — в виде минимального и максимального значений. Для оценки достоверности различий выборок использовали критерий Манна—Уитни. Все различия считались достоверными при значении  $p < 0,01$  [14].

### Результаты

Анализ концентрации исследуемых цитокинов у больных ХГВ и ХГС показал, что статистически значимые отличия от здоровых доноров выявлены

только в отношении индуцированной NDV и ФГА продукции цитокинов МНПК. У больных с минимальной активностью гепатита при отсутствии перипортальных некрозов и с минимальной выраженностью внутридольковой дегенерации (1 балл) определено достоверное снижение индуцированной NDV продукции ИФН- $\alpha$ , а в группе больных с высокой активностью гепатита установлено статистически значимое снижение индуцированной NDV продукции ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ,  $\alpha$ -ФНО, ИЛ-6 и индуцированной ФГА продукции  $\alpha$ -ФНО МНПК по сравнению со здоровыми донорами. Выявленные нами изменения цитокинового профиля у больных ХГВ и ХГС по сравнению с контрольной группой отражены в табл. 1. У больных с выраженностью перипортальных некрозов 5 баллов выявлено статистически значимое снижение стимулированной NDV продукции ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ,  $\alpha$ -ФНО и индуцированной ФГА продукции  $\alpha$ -ФНО МНПК по сравнению с группой контроля (табл. 2). У больных с 4 баллами внутридольковой дегенерации определено снижение индуцированной NDV продукции ИФН- $\alpha$ ,  $\alpha$ -ФНО, ИЛ-6 и индуцированной ФГА продукции  $\alpha$ -ФНО МНПК по сравнению с контрольной группой (табл. 3). В группе больных с уровнем портального воспаления 3 балла и фиброза 2 балла установлено снижение стимулированной NDV продукции ИФН- $\alpha$ ,  $\alpha$ -ФНО, ИЛ-6 МНПК по сравнению со здоровыми донорами. У больных с выраженностью фиброза 3 балла выявлено статистически значимое снижение активированной NDV продукции ИФН- $\alpha$ ,  $\alpha$ -ФНО МНПК по сравнению с контрольной группой (табл. 4, 5). Ни в одной группе больных ХГВ и ХГС не отмечено статистически

Таблица 1  
Выявленные изменения концентрации цитокинов периферической крови в сопоставлении с уровнем гистологической активности

Гистологическая активность		Контроль
минимальная (ИГА = 1—3 балла)	высокая (ИГА = 13—18 баллов)	
↓ инд. NDV ИФН- $\alpha$ * Медиана 30 мин:макс 28:215	↓ инд. NDV ИФН- $\alpha$ * Медиана 44 мин:макс 30:68 ↓ инд. NDV ИФН- $\gamma$ * Медиана 8,65 мин:макс 0:24 ↓ инд. NDV $\alpha$ -ФНО Медиана 65 мин:макс 15:170 ↓ инд. ФГА $\alpha$ -ФНО* Медиана 86 мин:макс 10:90 ↓ инд. NDV ИЛ-6* Медиана 60 мин:макс 20:80 ↑ сыв. ИЛ-6 ↑ спонт. ИЛ-1 $\beta$	инд. NDV ИФН- $\alpha$ Медиана 3100 мин:макс 1000:3500 инд. NDV ИФН- $\gamma$ Медиана 135 мин:макс 28:2100 инд. NDV $\alpha$ -ФНО Медиана 1600 мин:макс 1000:2000 инд. ФГА $\alpha$ -ФНО Медиана 704 мин:макс 100:2000 ↓ инд. NDV ИЛ-6 Медиана 750 мин:макс 700:800

Примечание. \* —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем; инд. NDV — индуцированная NDV продукция цитокинов МНПК; инд. ФГА — индуцированная ФГА продукция цитокинов МНПК; спонт. — спонтанная продукция цитокинов МНПК; сыв. — концентрация цитокинов в сыворотке крови. Здесь и в табл. 2—5: ИГА — индекс гистологической активности.

Таблица 2

Выявленные изменения концентрации цитокинов периферической крови в сопоставлении с выраженностью перипортальных некрозов

Перипортальные некрозы		Контроль
0 баллов	5 баллов	
↓ инд. NDV ИФН-α* Медиана 29 мин:макс 28:38	↓ инд. NDV ИФН-α* Медиана 29,9 мин:макс 29:58 ↓ инд. NDV ИФН-γ* Медиана 17,3 мин:макс 0:24 ↓ инд. NDV α-ФНО* Медиана 115 мин:макс 15:175 ↓ инд. ФГА α-ФНО* Медиана 31 мин:макс 10:86 ↑ спонт. α-ФНО ↑ спонт. ИЛ-1β ↑ спонт. ИЛ-6	инд. NDV ИФН-α Медиана 3100 мин:макс 1000:3500 инд. NDV ИФН-γ Медиана 135 мин:макс 28:2100 инд. NDV α-ФНО Медиана 1600 мин:макс 1000:2000 инд. ФГА α-ФНО Медиана 704 мин:макс 100:2000

Таблица 3

Выявленные изменения концентрации цитокинов периферической крови в сопоставлении с выраженностью внутридольковой дегенерации

Внутридольковая дегенерация		Контроль
1 балл	4 балла	
↓ инд. NDV ИФН-α* Медиана 29,5 мин:макс 0:250	↓ инд. NDV ИФН-α* Медиана 37,5 мин:макс 29:58 ↓ инд. NDV α-ФНО* Медиана 65 мин:макс 0:680 ↓ инд. ФГА α-ФНО* Медиана 7,5 мин:макс 3:86 ↓ инд. NDV ИЛ-6* Медиана 60 мин:макс 25:558 ↑ спонт. ИЛ-1β	инд. NDV ИФН-α Медиана 3100 мин:макс 1000:3500 инд. NDV α-ФНО Медиана 1600 мин:макс 1000:2000 инд. ФГА α-ФНО Медиана 704 мин:макс 100:2000 инд. NDV ИЛ-6 Медиана 750 мин:макс 700:800

значимых отличий концентрации изучаемых цитокинов в сыворотке крови и их спонтанной продукции МНПК по сравнению со здоровыми донорами. Однако нами была определена тенденция к увеличению концентрации ИЛ-4, ИЛ-6, α-ФНО в сыворотке крови и спонтанной продукции α-ФНО, ИЛ-1β, ИЛ-6 у больных с выраженными морфологическими изменениями в ткани печени по сравнению с группой контроля.

Таким образом, у больных ХГВ и ХГС уже при минимальной активности гепатита и незначительных морфологических изменениях в печени наблюдается достоверное снижение индуцированной NDV продукции ИФН-α, а у больных с высокой гистологической активностью и с максимально выраженными морфологическими изменениями в печени выявлено достоверное снижение индуцированной NDV продукции целого ряда цитокинов (ИФН-α, ИФН-γ, α-ФНО, ИЛ-6) и индуцированной ФГА продукции α-ФНО.

Анализируя относительное содержание субпопуляций лимфоцитов периферической крови и

иммунорегуляторный индекс (ИРИ) у больных ХГВ и ХГС в сопоставлении с выраженностью морфологических изменений в печени, статистически значимые отличия по сравнению со здоровыми донорами выявлены только в отношении ИРИ у больных с высокой активностью ХГВ и ХГС (1,2; от 0,9 до 1,2) и в группе больных с выраженностью перипортальных некрозов 5 баллов (1,1; от 0,7 до 1,2) по сравнению с группой контроля (1,75; от 1,3 до 2,3), при этом во всех группах больных определена тенденция к снижению ИРИ. Несмотря на отсутствие достоверных различий, во всех группах больных выявлена тенденция к снижению содержания натуральных киллеров (NK-клеток), Т-хелперов периферической крови (лимфоцитов CD4<sup>+</sup>), активированных лимфоцитов (CD38<sup>+</sup>). Наиболее выраженные изменения наблюдаются при высокой активности гепатита, когда имеет место снижение относительного содержания субпопуляций лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup> и HLADR<sup>+</sup> и ИРИ. Другой характер изменений наблюдается при максимальной выраженности портального воспаления в печени: у больных с 4 баллами портального воспаления выявлена тенденция к увеличению количества В-лимфоцитов периферической крови (CD20<sup>+</sup>) и лимфоцитов, экспрессирующих активационные молекулы CD25, CD38, HLADR.

Таблица 4

Выявленные изменения концентрации цитокинов периферической крови в сопоставлении с выраженностью портального воспаления

Портальное воспаление		Контроль
3 балла	4 балла	
↓ инд. NDV ИФН-α* Медиана 28 мин:макс 0:115 ↓ инд. NDV α-ФНО* Медиана 19 мин:макс 0:654 ↓ инд. NDV ИЛ-6* Медиана 12 мин:макс 0:230	↑ спонт. ИЛ-1β	инд. NDV ИФН-α Медиана 3100 мин:макс 1000:3500 инд. NDV α-ФНО Медиана 1600 мин:макс 1000:2000 инд. NDV ИЛ-6 Медиана 750 мин:макс 700:800

Таблица 5

Выявленные изменения концентрации цитокинов периферической крови в сопоставлении с выраженностью фиброза

Фиброз		Контроль
2 балла	3 балла	
↓ инд. NDV ИФН-α* Медиана 46 мин:макс 41:46	↓ инд. NDV ИФН-α* Медиана 45 мин:макс 29:250	инд. NDV ИФН-α Медиана 3100 мин:макс 1000:3500
↓ инд. NDV α-ФНО* Медиана 30 мин:макс 25:35	↓ инд. NDV α-ФНО* Медиана 175 мин:макс 15:697	инд. NDV α-ФНО Медиана 1600 мин:макс 1000:2000
↓ инд. NDV ИЛ-6* Медиана 52 мин:макс 45:56 ↑ сыв. α-ФНО ↑ сыв. ИЛ-4	↑ спонт. ИЛ-1β	инд. NDV ИЛ-6 Медиана 750 мин:макс 700:800

## Обсуждение

В настоящее время установлено, что колебания концентрации цитокинов в сыворотке крови до уровня 50 пг/мл находятся в пределах физиологических значений и не могут рассматриваться как повышение по сравнению со здоровыми донорами [15]. Время циркуляции свободных цитокинов в системном кровотоке колеблется от десятков минут до нескольких часов. Кроме того, показано, что цитокины присутствуют в крови больных в "скрытых" комплексах, не определяемых с помощью ИФА. При этом в связанном состоянии цитокины не инактивированы, а нековалентный характер связывания с рецепторами обеспечивает возможность диссоциации цитокинов, что может сопровождаться повторным увеличением их концентрации в сыворотке крови [16]. Низкие уровни цитокинов могут быть обусловлены высоким содержанием растворимых рецепторов к этим цитокинам, так как уровень свободных рецепторов превышает концентрацию цитокинов в сыворотке крови в десятки — сотни раз. Таким образом, определяемые в ИФА сывороточные уровни свободных цитокинов не отражают истинных концентраций цитокинов в сыворотке крови. По нашему мнению, у больных ХГВ и ХГС диагностическое значение имеет не только определение концентрации свободных цитокинов в сыворотке крови, но и установление функциональных резервов способности МНПК вырабатывать цитокины в ответ на стимуляцию [8, 17, 18]. Достоверное снижение индуцированной NDV продукции ИФН- $\alpha$  уже при минимальной активности ХГВ и ХГС и незначительных морфологических изменениях в печени, а также достоверное снижение индуцированной NDV продукции целого ряда цитокинов (ИФН- $\gamma$ ,  $\alpha$ -ФНО, ИЛ-6), в том числе ИФН- $\alpha$  у больных с высокой активностью процесса и с максимально выраженными морфологическими изменениями в печени, подтверждают суждение о хроническом вирусном гепатите как об иммунокомпromетированном состоянии и отражают снижение функциональной способности МНПК вырабатывать цитокины в ответ на вирусную инфекцию [7, 8, 18, 19]. Уменьшение продукции ИФН- $\alpha$  приводит к нарушению противовирусной защиты организма, что способствует длительной персистенции вируса и хронизации гепатита. Установленное нами снижение способности МНПК вырабатывать  $\alpha$ -ФНО в ответ на стимуляцию ФГА у больных хроническими вирусными гепатитами с высокой активностью свидетельствует о неполноценности клеточного звена иммунитета, что приводит к нарушению активации цитотоксических лимфоцитов и реализации апоптотической гибели клеток, в первую очередь вирусинфицированных. В то же время ограничение продукции  $\alpha$ -ФНО у больных ХГВ и ХГС с выраженными очаговыми и перипортальными некрозами печени может рассматриваться как защитная реакция иммунитета, направленная на предотвращение развития необратимого повреждения органов и тканей [19].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что определение концентрации

цитокинов только в сыворотке крови малоинформативно. Нами установлено достоверное снижение продукции цитокинов в ответ на вирусную стимуляцию, что подтверждает необходимость изучения стимулированной NDV и ФГА продукции цитокинов МНПК у больных ХГВ и ХГС.

У большинства обследованных больных выявлена тенденция к изменению содержания субпопуляций лимфоцитов периферической крови, отвечающих за развитие клеточного иммунного ответа. Снижение у всех больных содержания лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD16<sup>+</sup> (натуральные киллеры) и CD4<sup>+</sup> (Т-хелперы) свидетельствует о недостаточности клеточного звена иммунитета, как врожденного, так и приобретенного, что может способствовать длительной персистенции вирусов и хронизации вирусных гепатитов [20—22]. Состояние иммунодефицита при ХГВ и ХГС подтверждается снижением ИРИ во всех группах больных. Нарушение процессов активации и пролиферации Т- и В-лимфоцитов у большинства больных находит отражение в снижении содержания лимфоцитов, несущих маркер CD38, по сравнению с таковым у здоровых доноров.

Наиболее выраженные изменения выявлены при высоком уровне гистологической активности, когда наблюдается не только снижение численности субпопуляций лимфоцитов, отвечающих за развитие клеточного иммунного ответа (лимфоциты CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>), и ИРИ, но и снижение содержания лимфоцитов CD20<sup>+</sup>, отвечающих за развитие гуморального иммунитета, а также снижается содержание активационных молекул CD38<sup>+</sup> и молекул антигенной презентации HLADR<sup>+</sup>. Снижение лимфоцитов HLADR<sup>+</sup> может приводить к нарушению представления антигена, что в конечном итоге препятствует развитию приобретенных иммунных реакций [17, 20—22]. У больных ХГВ и ХГС при максимальной выраженности портального воспаления в печени увеличивается количество В-лимфоцитов периферической крови (CD20<sup>+</sup>) и лимфоцитов, экспрессирующих активационные молекулы CD25, CD38, HLADR, что рассматривается как проявление системного иммунного ответа на фоне местной иммунной реакции в виде лимфоидной инфильтрации ткани печени [20, 21]. Следовательно, нами установлено нарушение врожденного и приобретенного звеньев клеточного иммунного ответа у больных ХГВ и ХГС. Достоверное снижение ИРИ является важнейшим показателем, отражающим состояние иммунодефицита у больных ХГВ и ХГС, что подтверждается снижением резервных функциональных способностей МНПК вырабатывать цитокины в ответ на стимуляцию.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о необходимости проводить комплексное обследование больных ХГВ и ХГС, включающее в себя не только определение концентрации цитокинов в сыворотке крови, но и изучение стимулированной NDV и ФГА продукции цитокинов МНПК с обязательным вычислением ИРИ для прогноза течения заболевания и подбора адекватной, в том числе противовирусной, терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Исашкин В. Г., Маммаев С. Н., Лукина Е. А. и др. Особенности иммунного ответа у больных хроническим вирусным гепатитом С. Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 2001; 11 (3): 24–29.
2. Курамин Д. Х., Толоконская Н. П., Кожеевникова В. С., Мальтийский М. Л. Субпопуляции лимфоцитов и уровень провоспалительных цитокинов в крови больных вирусным гепатитом С и сочетанным вариантом С + В. Журн. микробиол. 2002; 1: 42–48.
3. Наследникова И. О., Белобородова Е. В., Рязанцев Н. В. и др. Иммунорегуляторные цитокины и хронизация вирусного гепатита С: клинико-иммунологические параллели. Клин. мед. 2005; 9: 40–44.
4. Скляр Л. Ф., Никифоров Н. Д., Маркелова Е. В., Попов А. Ф. Цитокиновый профиль при хроническом гепатите С. Клин. мед. 2005; 10: 40–44.
5. Abayli B., Canataroglu A., Akkiz H. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection. Turkish J. Gastroenterol. 2003; 14 (1): 7–11.
6. Brady M. T., MacDonald A. J., Rowan A. G., Mills K. H. Hepatitis C virus non-structural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes. Eur. J. Immunol. 2003; 33 (12): 3448–3457.
7. Gramenzi A., Andreone P., Loggi E. et al. Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. J. Viral Hepat. 2005; 12 (5): 525–530.
8. Sarih M., Bouchrit N., Benslimane A. Different cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from patients with persistent and self-limited hepatitis C virus infection. Immunol. Lett. 2000; 74 (2): 117–120.
9. Курамин Д. Х., Толоконская Н. П., Сяков А. Н. и др. Содержание цитокинов Th1- и Th2-типа в сыворотке крови больных гепатитом С. Журн. микробиол. 2001; 1: 57–61.
10. Собчак Д. М., Монахова Э. А. Показатели иммунитета у больных хроническим гепатитом С при различной гистологической активности. Клин. мед. 2004; 4: 49–52.
11. Falasca K., Ucciferri C., Dalessandro M. et al. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. Ann. Clin. Lab. Sci. 2006; 36 (2): 144–150.
12. Spanakis N. E., Garinis G. A., Alexopoulos E. C. et al. Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection. J. Clin. Lab. Anal. 2002; 16 (1): 40–46.
13. Dong Y., Zhang H. F., Chen H. et al. The cytokine secretion of peripheral blood mononucleocytes from patients infected with HCV. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 2004; 20 (3): 331–333.
14. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. М.: Практика; 1998.
15. Тугуз А. Р., Данилина Д. В., Громова Е. Г. и др. Спонтанная и стимулированная продукция цитокинов нейтрофильными гранулоцитами здоровых доноров. Иммунология 2002; 25 (3): 156–158.
16. Тугуз А. Р., Громова Е. Г., Малахова Н. В. и др. Динамика цитокинов у онкологических больных при применении экстракорпоральных методов детоксикации в раннем послеоперационном периоде. Иммунология 2001; 5: 56–58.
17. Grakoui A., Shoukry N. H., Woollard D. J. et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. Science 2003; 302 (5645): 659–662.
18. Paul S., Tabassum S., Islam M. N. A study on interferon-gamma (IFN-gamma) response by T cells stimulated by hepatitis B virus core antigen. Bangladesh Med. Res. Coun. Bull. 2004; 30 (1): 9–15.
19. Рязанцева Н. В., Наследникова И. О., Зима А. П. Молекулярные механизмы изменения продукции TNF- $\alpha$  мононуклеарами крови при хроническом вирусном гепатите С. Бюл. экпер. биол. 2005; 139 (2): 191–195.
20. Никитин В. Ю., Жданов К. В., Гусев Д. А. и др. Изучение показателей Т-клеточного и В-клеточного звеньев иммунитета у больных с хроническим гепатитом С. Terra Medica Nova 2004; 1 (3): 14–16.
21. Гусев Д. А., Жданов К. В., Лобзин Ю. В. и др. Сравнительный анализ некоторых показателей иммунитета при желтушных формах гепатитов В, С и В + С. Мед. иммунол. 2001; 3 (2): 217.
22. Юшук Н. Д., Дудина К. Р., Знойко О. О. и др. Иммунный статус больных с различными исходами острого гепатита С. Тер. арх. 2005; 11: 32–37.

Поступила 11.08.08

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 616.9-022.369:578.835.3]-07

О. И. Сагалова<sup>1</sup>, И. В. Брызгалова<sup>1</sup>, А. Т. Подколзин<sup>2</sup>, В. В. Малеев<sup>2</sup>

## НОРОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ В МНОГОПРОФИЛЬНЫХ СТАЦИОНАРАХ ДЛЯ ВЗРОСЛЫХ

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Клиника Челябинской государственной медицинской академии Росздрава; <sup>2</sup>ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

**Цель исследования.** Определить значимость норовирусов в возникновении вспышек внутрибольничных острых кишечных инфекций (ОКИ) в соматических стационарах, изучить клинические и эпидемиологические аспекты внутрибольничной норовирусной инфекции.

**Материалы и методы.** Обследованы 70 взрослых пациентов, переведенных в инфекционный стационар из соматических отделений многопрофильных стационаров с признаками ОКИ вследствие групповых и спорадических заболеваний в период 2003–2007 гг., с использованием рутинных методов исследования и комплекса диагностических тестов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения ротавирусов группы А, норовирусов (НВ), астровирусов, аденовирусов сальмонелл, кампилобактерий термофильной группы, шигелл и энтероинвазивных эшерихий (ЕИЭС). Часть выделенных в 2006–2007 гг. штаммов была протипирована специфическими для генетического кластера G2/4-праймерами.

**Результаты.** Рутинными методами исследования не удалось выявить причины внутрибольничного инфицирования. Методом ПЦР этиология ОКИ была установлена у 77,8% больных. НВ второго генотипа (G2) обнаружены в виде моноинфекции в 87,8% верифицированных случаев, в ассоциации с другими микроорганизмами — в 12,2%. Протипированные НВ принадлежали к кластеру G2/4. Отличительными чертами внутрибольничной норовирусной инфекции были зимне-весенняя сезонность и нетяжелое течение.

**Заключение.** Показана существенная роль норовирусов в возникновении внутрибольничных вспышек ОКИ у пожилых в зимне-весенний период.

Ключевые слова: норовирус, внутрибольничные инфекции, вспышки, полимеразная цепная реакция, взрослые