

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616.36-002.14:578.891]:616-097

**ТАРАСЮК ВЛАДИМИР ВАСИЛЬЕВИЧ**

**СОСТОЯНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ И ЭФФЕКТОРНЫХ  
МЕХАНИЗМОВ Т-СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА  
У БОЛЬНЫХ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С  
И МИКСТ-ГЕПАТИТОМ В+С**

14.00.36 – аллергология и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Минск 2006

Работа выполнена в УО «Белорусский государственный медицинский университет» и ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук, профессор  
**Титов Л. П.**, ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»  
Министерства здравоохранения Республики Беларусь, директор

**Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук, профессор  
**Цыркунов В. М.**, УО «Гродненский государственный медицинский университет»,  
зав. кафедрой инфекционных болезней с курсом  
детских инфекций

доктор медицинских наук, профессор  
**Пивень Н. В.**, Институт биоорганической химии  
Национальной Академии Наук Беларуси, зав.  
лабораторией медицинского микроанализа

**Оппонирующая организация:** ГУО «Белорусская медицинская академия  
последипломного образования»

Защита состоится «15» сентября 2006 г. в 12<sup>00</sup> часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при УО «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, проспект Дзержинского, д. 83, тел. 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » августа 2006 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций,  
кандидат медицинских наук, доцент

**А. М. Близнюк**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы диссертации

Вирусные гепатиты являются одной из наиболее значимых проблем здравоохранения и медицинской науки. Высокий уровень распространенности гепатита С (ГС) и его хронизации (80–90 %), сопровождающийся значительным ростом заболеваемости хроническим ГС, прогрессирование инфекционного процесса в цирроз и первичный рак печени, преимущественное поражение лиц молодого возраста, отсутствие специфической профилактики и низкая эффективность существующих методов лечения определяют повышенное внимание к данному заболеванию (М. С. Балаян, М. И. Михайлов, 1999; М. А. Абдукадырова, 2002; Е. И. Змушко, 2002; В. И. Лучшев, 2004; С. Н. Жаров, 2005; N. Boyer, P. Marcellin, 2000; M. J. Alter et al., 2002; R. T. Marinho et al., 2004). В этиологической структуре вирусных гепатитов возрастает доля микст-гепатита В+С (МГВС), что требует совершенствования его дифференциальной диагностики и лечения (С. Н. Соринсон, 1999; М. И. Михайлов, 2000; А. А. Ключарева, 2003; О. В. Корочкина, О. Л. Соболевская, 2004).

До сих пор не установлены точные механизмы персистенции вируса и прогрессирования заболевания, неоднозначны взгляды на механизмы развития протективного иммунитета. Предполагается, что взаимодействие вируса гепатита С и иммунной системы организма предопределяет характер течения и исхода заболевания. Поэтому внимание исследователей все чаще обращается к функции иммунной системы как важнейшего фактора контроля инфекции и иммунозависимого повреждения печени. Основную роль в патогенезе ГС играют иммуноопосредованные Т-зависимые механизмы (Л. П. Титов, 1999; Т. М. Игнатова, В. В. Серов, 2001; В. М. Цыркунов, 2003; Д. Х. Курамшин и др., 2004; M. G. Kozeil et al., 2001; H. R. Rosen, 2003; H. Wedemeyer et al., 2004). Патогенетически важными являются процессы миграции и активации CD4<sup>+</sup>Т-хелперов (Th) 1 типа и цитотоксических CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в организме (Е. И. Рындина, 2001; Т. А. Семененко, 2000; N. H. Gruner et al., 2000; H. Sugiyama et al., 2001; S. Ward et al., 2002). Механизмы активации и реализация регуляторных и эффекторных функций вирусспецифических клонов Т-клеток в значительной мере ассоциируются со степенью экспрессии ими соответствующих поверхностных молекул. Персистенция вируса и формирование анергии в значительной степени обусловлены нарушением механизмов костимуляции и проявлениями апоптоза (А. О. Буеверов, 2000; Е. В. Дмитриева и др., 2003; А. Г. Давыдовский, 2004; О. Б. Жукова и др., 2005; С. Ferrari et al., 2003). Современные представления об антигенспецифической анергии и механизмах межклеточной кооперации в иммунном ответе позволяют по-новому подойти к оценке состояния противовирусного иммунитета, создают предпосылки для

разработки адекватных методов иммунодиагностики и стратегий иммунокоррекции при вирусных гепатитах (А. А. Ярилин, 1999; Л. П. Титов, 2005; Н. Wedemeyer et al., 2004).

### **Связь работы с крупными научными программами, темами**

Диссертационная работа выполнялась в течение 2000–2005 гг. в лаборатории иммунологии кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии УО «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ) и лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» (НИИЭМ). Отдельные этапы работы выполнялись по заданию «Разработать методы иммунодиагностики молекулярных повреждений механизмов активации Т-системы иммунитета у больных вирусным гепатитом С и микст-инфекцией (В+С) и подходы к их иммунокоррекции» (2001–2005 гг., № госрегистрации 20014238) в рамках Государственной научно-технической программы «Инфекции и медицинские биотехнологии», гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований на тему «Влияние ингибиторов фосфодиэстеразы (теофиллин и др. препараты) на процессы костимуляции Т-лимфоцитов больных хроническими гепатитами В и С (*in vivo* и *in vitro*)» (2003–2004 гг., № госрегистрации 20032828).

**Цель исследования:** изучить молекулярно-клеточные механизмы функционирования Т-системы иммунитета у больных вирусным гепатитом С и микст-гепатитом В+С, разработать методы диагностики иммунологических нарушений и определить подходы к их иммунокоррекции.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить иммунофенотипические характеристики клеток Т-системы иммунитета больных различными формами гепатита С и микст-гепатитом В+С.
2. Изучить функциональное состояние Т-системы иммунитета больных различными формами гепатита С и микст-гепатитом В+С.
3. Установить клеточно-молекулярные маркеры повреждения Т-системы иммунитета при различных формах гепатита С и микст-гепатите В+С и разработать методы иммунодиагностики.
4. Исследовать влияние индукторов циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) на функцию Т-системы иммунитета при различных формах гепатита С *in vitro* и *in vivo* и обосновать подходы к иммунокоррекции.

### **Объект и предмет исследования**

Объектом исследования являлись мононуклеары периферической крови (МПК) и сыворотка больных ГС и МГВС. Предмет исследования – иммунофенотипические и функциональные характеристики Т-системы иммунитета больных различными формами ГС и МГВС.

## Методология и методы проведения исследования

В работе использованы следующие методы исследования:

- *клинико-лабораторные*: сбор данных анамнеза, клинический осмотр, общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимические исследования сыворотки крови;
- *иммунологические*: выделение и иммунофенотипирование МПК (CD3, CD4, CD8, CD20, CD16, CD11b, CD25, HLA-DR, CD95, CD28, Т-клеточного рецептора (ТКР)  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ -типов); определение пролиферативной и цитотоксической активности МПК, продукции интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) и интерлейкина 4 (ИЛ-4) в культуре МПК, концентрации общего иммуноглобулина класса Е (IgE) и анти-С1q-аутоантител в сыворотке крови; постановка внутрикожных тестов с Т-клеточным антигеном (туберкулином) и теофиллином (ТФ);
- *статистические*: статистическая обработка данных с использованием компьютерных программ, определение диагностической и прогностической значимости показателей.

## Научная новизна и значимость полученных результатов

1. Впервые получены данные о количественном содержании и соотношении в периферической крови  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и костимуляторной молекулы CD28 у больных ГС и МГВС. Существенные отклонения от нормы содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих ТКР  $\gamma\delta$ -типа и CD28, лежат в основе патогенеза ГС и МГВС у всех обследованных больных и подтверждают наличие анергии при ГС на локальном и системном уровнях.

2. Впервые предложены расчетные индексы на основе определения экспрессии маркеров адгезии, активации и апоптоза мононуклеарами периферической крови — CD11b<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, — позволяющие объективно оценить функциональное состояние клеток Т-системы иммунитета у больных ГС и МГВС.

3. Впервые установлена клиническая значимость определения уровней общего IgE и анти-С1q-аутоантител в сыворотке крови больных ГС и МГВС для оценки дисбаланса CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, определена роль IgE- и комплемент-зависимых воспалительных и аутоиммунных процессов в патогенезе ГС и МГВС.

4. Впервые выявлен иммуномодулирующий эффект индукторов цАМФ, в частности теофиллина, на функциональное состояние клеток иммунной системы больных ГС, о чем свидетельствует оптимизация функциональной активности лимфоцитов и баланса продуцируемых ими цитокинов *in vitro*, а также восстановление функции CD4<sup>+</sup>Th1-клеток и механизмов гиперчувствительности замедленного типа *in vivo*.

## **Практическая значимость полученных результатов**

1. Разработаны новые методы иммунодиагностики, позволяющие объективно оценить функциональное состояние Т-системы иммунитета для мониторинга течения ГС и МГВС. Поданы две заявки на изобретение (№ а20060611; № а20060612). Подготовлены и представлены на утверждение в Министерство здравоохранения Республики Беларусь две инструкции по применению (регистрационные №№ 184-1205 и 185-1205).

2. Обоснована возможность использования препарата ТФ в качестве иммуномодулятора в комплексной терапии больных хроническим гепатитом С (ХГС), что является основанием для проведения доклинических исследований препарата по новому назначению.

3. Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии и кафедре инфекционных болезней БГМУ, а также в научно-практическую работу Городской инфекционной клинической больницы г. Минска.

## **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Комплекс фенотипических маркеров лимфоцитов (CD4, CD8, CD11b, CD16, CD25, CD95, HLA-DR, ТКР  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ -типов и CD28) и их соотношений позволяет выявить дисбаланс иммунорегуляторных субпопуляций клеток Т-системы, повреждение механизмов активации/регуляции, костимуляции и апоптоза, оценить характер течения и прогноз заболевания у больных ГС и МГВС.

2. Функциональное состояние иммунной системы больных ГС характеризуется угнетением пролиферативной и цитотоксической активности МПК, дисбалансом продукции цитокинов Th1- и Th2-типов, снижением внутрикожного ответа на Т-клеточный антиген (туберкулин), что свидетельствует о снижении функциональной активности Т-клеточного звена иммунитета и формировании состояния анергии.

3. При различных формах ГС и МГВС выявлена дисфункция В-клеточного звена иммунитета — увеличение уровней общего IgE и анти-C1q-аутоантител в сыворотке крови, — что указывает на участие IgE-зависимого воспалительного и аутоиммунного механизмов в патогенезе этих заболеваний.

4. Индукторы цАМФ (ТФ и дибутирил цАМФ) оказывают *in vitro* и *in vivo* модулирующий эффект на механизмы активации и костимуляции лимфоцитов больных ГС, что обосновывает возможность применения препарата ТФ как иммуномодулятора в комплексной терапии больных ХГС.

## **Личный вклад соискателя**

Научным руководителем предложена тема диссертации и ее методическое решение. Совместно с научным руководителем сформулированы цели и задачи исследования, определены методы и объем исследований. Соискателем

самостоятельно выполнены все исследования, создана компьютерная база данных, проведена статистическая обработка результатов, анализ данных и написание всех разделов диссертации. Совместно с научным руководителем сформулированы выводы и практические рекомендации. Участие соавторов в работе отражено в разделе «Материалы и методы» и представлено в опубликованных работах.

### **Апробация результатов диссертации**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на съездах и конференциях в Республике Беларусь, в странах Европы и США. Устные доклады сделаны на конференции «Дни медицинской науки» (научная секция «Актуальные вопросы микробиологии и эпидемиологии») и на конференции, посвященной 80-летию БГМУ (секция «Инфекционная патология») (г. Минск, 2001), на научно-практических конференциях НИИЭМ по итогам выполнения ГНТП «Инфекции и медицинские биотехнологии» (г. Минск, 2002, 2003). Стендовые доклады были представлены на VI Всероссийской научной конференции «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2002); на Евроконференции «Естественный иммунитет» (г. Грейсфольд, 2002); на XII Международном конгрессе по микробиологии, микологии и вирусологии (г. Париж, 2002); на летней школе Европейской академии аллергологов и клинических иммунологов (г. Вильнюс, 2003); на конгрессах Европейской академии аллергологов и клинических иммунологов (г. Париж, 2003; г. Вена, 2006); на конференциях федерации обществ клинических иммунологов (г. Париж, 2003; г. Сан-Франциско, 2006); на Всемирном аллергологическом конгрессе (г. Ванкувер, 2003; г. Мюнхен, 2005); на конференциях Американского колледжа аллергии, астмы и иммунологии (г. Новый Орлеан, 2003; г. Бостон, 2004) и Американской академии аллергии, астмы и иммунологии (г. Сан-Антонио, 2005; г. Майами, 2006).

### **Опубликованность результатов**

По материалам диссертации опубликовано 29 научных работ, включающих 4 статьи в рецензируемых журналах, 6 статей в рецензируемых сборниках и материалах конференций, 9 тезисов в рецензируемых журналах (8 — в зарубежных изданиях), 10 тезисов в зарубежных сборниках докладов (всего 70 страниц). Самостоятельно опубликованы 2 научные работы.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, основной части, включающей 5 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, 3 главы результатов собственных исследований), заключения с выводами, списка использованных источников (125 русскоязычных и 150 иностранных источников) и приложений. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, иллюстрирована 31 таблицей и 10 рисунками.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

В 2000–2005 гг. обследовано 104 больных различными формами ГС и МГВС в возрасте 18–48 лет (в среднем  $26,0 \pm 1,2$  лет), находившихся на стационарном лечении в Городской инфекционной клинической больнице г. Минска. Группа больных с острым гепатитом С (ОГС) включала 38 человек, с ХГС — 42 и с МГВС — 24. Диагноз вирусного гепатита устанавливался на основании клинико-лабораторных данных, определении серологических маркеров. Тяжесть острого вирусного гепатита и клинико-биохимическая степень активности ХГС оценивали по клинико-лабораторным критериям (приказ № 66 МЗ РБ от 2.04.1993). Контрольную группу в количестве 25 человек составили доноры, сопоставимые по возрасту с группой больных.

Больных ОГС и МГВС обследовали трижды: при поступлении (разгар болезни), на 2-й неделе лечения и при выписке, а больных ХГС — дважды: при поступлении и выписке (через 2–3 недели). Материалом для иммунологических исследований являлась венозная кровь, взятая из локтевой вены натощак в утреннее время. МПК выделяли из крови, стабилизированной гепарином (20 ЕД/мл), путем градиентного центрифугирования (А. Бейум, 1980).

*Иммунофенотипирование МПК* (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD11b, CD25, CD95, HLA-DR, CD28, ТКР  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ -типа) выполняли методом непрямой иммунофлюоресценции на проточном цитофлюориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США). Для интегральной оценки процессов антигенпрезентации/костимуляции ИКК рассчитывали соотношения клеток, экспрессирующих ТКР ( $\gamma\delta$  и  $\alpha\beta$ ) и CD28 – индексы  $\alpha\beta$ ТКР/CD28 и  $\gamma\delta$ ТКР/CD28. Характеристика сочетанной экспрессии МПК молекул активации (CD25, HLA-DR), адгезии (CD11b) и апоптоза (CD95) проведена путем расчета и оценки соотношений клеток, экспрессирующих эти маркеры – индексы  $CD95^+/CD11b^+$ ,  $CD95^+/CD25^+$ ,  $CD95^+/HLA-DR^+$ ,  $CD11b^+/CD25^+$ ,  $CD11b^+/HLA-DR^+$  и  $CD25^+/HLA-DR^+$ .

*Функциональную активность МПК* определяли по их пролиферативному ответу на фитогемагглютинин (ФГА) и туберкулин (PPD) ультрамикрометодом капельных культур в планшетах Тerasaki на  $\beta$ -счетчике LS 1803 («Beckman», США) (С. Найт, 1990); цитотоксическую активность МПК против клеток К-562 — в краткосрочных (4-часовых) цитотоксических тестах (Г. Фримель, 1987); продукцию ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 — в супернатантах, полученных при культивировании МПК в присутствии ФГА в концентрации 10 мкг/мл и без стимулятора, иммуноферментным методом (ИФА) с помощью наборов «ИЛ-4–ИФА–БЕСТ» и « $\gamma$ -Интерферон–ИФА–БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия) на ИФА-анализаторе «ELISA Processor II» («Behring GmbH», Германия). Для характеристики сочетанной продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 и их баланса рассчитывалось соотношение ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4. Содержание общего IgE и анти-С1q-аутоантител в сы-



воротке крови определяли наборами «IgE–ИФА–БЕСТ–стрип» («Вектор-Бест», Россия) и «Anti-C1q-autoantibodies» («Buehlman», Швейцария) на ИФА-анализаторе «ELISA Processor II» («Behring GmbH», Германия). Исследование *in vivo* локальных механизмов клеточного звена иммунитета проводили путем постановки внутрикожных тестов с туберкулином в дозе 5 туберкулиновых единиц (ТЕ).

*Оценку иммуномодулирующего влияния индукторов цАМФ (ТФ и дибутирил-цАМФ) in vitro* проводили по пролиферативной активности МПК в реакции бласттрансформации лимфоцитов (И. И. Копелян и соавт., 1972) и по продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 в супернатантах краткосрочной (24 часа) культуры МПК при культивировании с ФГА (10 мкг/мл), ТФ (15 мкг/мл) и дибутирил-цАМФ (20 мкМ) методом ИФА. *In vivo* влияние ТФ на Т-систему иммунитета оценивалось путем постановки двойных внутрикожных проб с РРД (5 ТЕ) и ТФ (15 мкг/мл) (Л. П. Титов и соавт., 1990).

*Статистический анализ результатов* проводили с помощью программ Microsoft Excel и StatSoft STATISTICA 5.5 методами описательной статистики ( $M \pm m$ ) и с расчетом t-критерия Стьюдента при уровне вероятности различий 95 % ( $P < 0,05$ ). Для предложенных показателей проводился расчет чувствительности, специфичности, прогностической ценности положительного и отрицательного результатов. Диагностический уровень («cut-off point») определяли по формуле:  $M + 2SD$  (Р. Флетчер и соавт., 1998).

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Имунофенотипическая характеристика МПК больных ГС и МГВС

У больных ХГС и МГВС установлено значительное снижение общего количества  $CD3^+$ Т-лимфоцитов и  $CD4^+$ Т-хелперов (табл. 1). При ОГС наблюдалась только тенденция к их снижению (различия с аналогичными показателями в контрольной группе не достоверны;  $P > 0,05$ ), однако содержание цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD8^+$ -клеток) было увеличено ( $P < 0,05$ ). В остальных группах количество  $CD8^+$ -клеток не отличалось от показателей группы контроля ( $P > 0,05$ ). Следовательно, имело место снижение иммунорегуляторного индекса (ИРИ) во всех группах больных, особенно при МГВС, по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ), что свидетельствует о Т-клеточном дефиците и дисбалансе иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов. Отмечено увеличение содержания естественных киллеров ( $CD16^+$ -клеток) у больных ОГС ( $P > 0,05$ ), вероятно, связанное с компенсаторной реакцией иммунной системы, и их уменьшение при ХГС ( $P > 0,05$ ) и МГВС ( $P < 0,05$ ), что указывает на угнетение клеточных механизмов естественного иммунитета.

## Имунофенотипические показатели МПК больных ГС и МГВС

Показатель, %	Контрольная группа (n=25)	Группы больных		
		ОГС (n=38)	ХГС (n=42)	МГВС (n=24)
CD3 <sup>+</sup> Т-лимфоциты	70,13 ± 1,21	67,81 ± 1,43	60,58 ± 0,79*	58,92 ± 2,02*
CD4 <sup>+</sup> Т-клетки	42,25 ± 1,53	41,35 ± 1,37	37,29 ± 0,91*	32,85 ± 1,71*
CD8 <sup>+</sup> Т-клетки	29,04 ± 1,45	34,04 ± 1,07*	30,47 ± 0,90	32,74 ± 2,41
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (ИРИ)	1,56 ± 0,11	1,28 ± 0,05*	1,30 ± 0,04*	1,10 ± 0,07*,**
CD20 <sup>+</sup> В-лимфоциты	12,61 ± 0,94	12,62 ± 0,82	12,19 ± 0,49	13,85 ± 0,78
CD16 <sup>+</sup> -клетки	16,73 ± 1,3	18,53 ± 1,10	14,24 ± 0,91	13,05 ± 0,82*

Примечания: \* различия с контрольной группой достоверны при  $P < 0,05$ ; \*\* различия с больными ОГС и ХГС достоверны при  $P < 0,05$ .

Фенотипический анализ Т-лимфоцитов показал, что относительное количество  $\alpha\beta$ Т-клеток достоверно увеличено только при ОГС ( $P < 0,05$ ), а количество  $\gamma\delta$ Т-клеток значительно снижено во всех группах больных ( $P < 0,05$ ). Выявлено также снижение экспрессии костимуляторной молекулы CD28 на Т-лимфоцитах у больных ГС и МГВС, особенно при ХГС ( $P < 0,05$ ). При сравнении индексов  $\alpha\beta$ ТКР<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> и  $\gamma\delta$ ТКР<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> у больных ХГС и МГВС отмечено преимущественное снижение активности процессов костимуляции Т-лимфоцитов (индекс  $\alpha\beta$ ТКР<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> увеличен —  $1,38 \pm 0,12$  и  $1,21 \pm 0,05$  против  $1,06 \pm 0,05$  в контроле,  $P < 0,05$ ), в то время как при ОГС выявлено в большей степени снижение количества  $\gamma\delta$ Т-клеток (индекс  $\gamma\delta$ ТКР<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> снижен —  $0,053 \pm 0,008$  против  $0,096 \pm 0,014$  в контроле,  $P < 0,05$ ).

При оценке функциональных характеристик МПК больных ОГС и ХГС выявлено достоверное повышение экспрессии маркеров межклеточной адгезии (CD11b) и активации (CD25 и HLA-DR) по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ), а при МГВС — только увеличение количества CD11b<sup>+</sup>- и HLA-DR<sup>+</sup>-клеток ( $P < 0,05$ ). Экспрессия молекулы CD95 у больных ГС была также значительно повышена по сравнению с таковой в контрольной группе ( $P < 0,05$ ), а при МГВС имела место только тенденция к её увеличению ( $P < 0,1$ ).

Анализ показателей, отражающих экспрессию иммунокомпетентными клетками (ИКК) молекул адгезии, активации и апоптоза, показал необходимость оценки функционального состояния лимфоцитов во взаимосвязи между ними путем расчета их соотношений (табл. 2). Соотношения CD11b<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> и CD25<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, или индексы активации, характеризуют функциональное состояние ИКК, процессы ранней и поздней активации, а расчет индексов CD95<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, или индексов апоптоза, позволяет оценить вклад каждого этапа активации в исход развития клеточного иммунного ответа. У больных различными формами ГС и МГВС индексы CD11b<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> были увеличены по сравнению с

таковыми в контроле, что связано со значительным снижением функциональной активности лимфоцитов. Снижение индекса  $CD25^+/HLA-DR^+$ , особенно при ХГС ( $P < 0,05$ ), свидетельствует о снижении количества клеток, экспрессирующих маркеры ранней активации, и указывает на истощение функционального резерва ИКК.

Таблица 2

Соотношения клеток, экспрессирующих маркеры адгезии, активации и апоптоза при ГС и МГВС

Индексы	Контрольная группа (n=25)	Группы больных		
		ОГС (n=38)	ХГС (n=42)	МГВС (n=24)
$CD11b^+/CD25^+$	$1,04 \pm 0,3$	$1,89 \pm 0,33$	$2,36 \pm 0,36^*$	$2,03 \pm 0,22^*$
$CD11b^+/HLA-DR^+$	$0,94 \pm 0,18$	$1,61 \pm 0,22^*$	$1,48 \pm 0,11^*$	$1,43 \pm 0,20$
$CD25^+/HLA-DR^+$	$1,05 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,12$	$0,81 \pm 0,06^*$	$0,82 \pm 0,09$
$CD95^+/CD11b^+$	$2,08 \pm 0,08$	$2,17 \pm 0,22$	$2,76 \pm 0,33^*$	$2,29 \pm 0,24$
$CD95^+/CD25^+$	$2,14 \pm 0,31$	$4,24 \pm 0,58^*$	$6,23 \pm 0,92^*$	$4,38 \pm 0,53^*$
$CD95^+/HLA-DR^+$	$1,93 \pm 0,22$	$3,15 \pm 0,32^*$	$3,64 \pm 0,38^*$	$3,12 \pm 0,56^*$

Примечание: \* различия с контрольной группой достоверны при  $P < 0,05$ .

С другой стороны, значительное увеличение индексов апоптоза у больных ГС и МГВС (табл. 2) указывает на снижение адгезивной и активационной способности Т-лимфоцитов на фоне их повышенной готовности к апоптозу, что лежит в основе развития вирусспецифической анергии. Анализ индексов апоптоза при ГС и МГВС, в частности  $CD95^+/CD25^+$  (рис. 1), показал их способность выявлять повреждения молекулярно-клеточных механизмов функционирования Т-клеток.

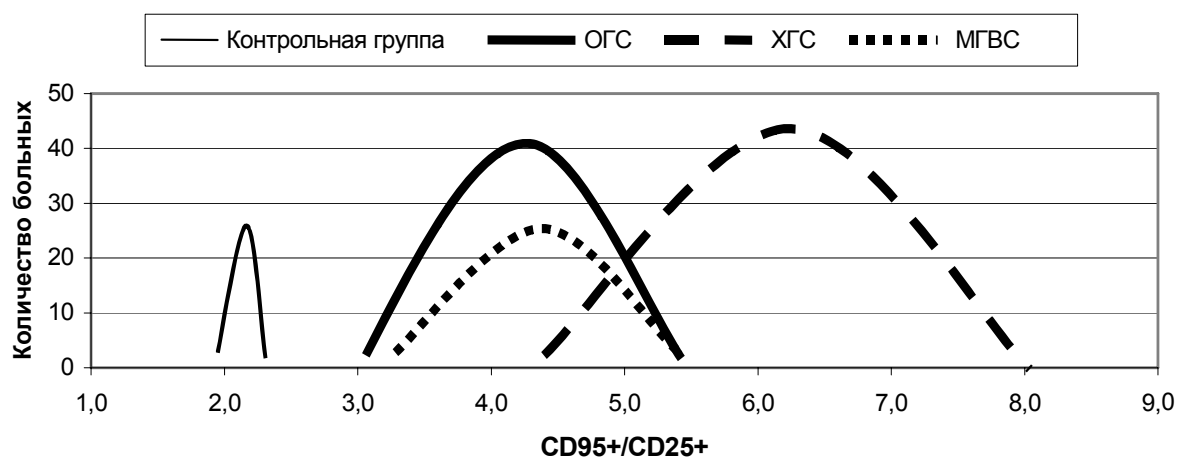


Рис. 1. Значение  $CD95^+/CD25^+$ -индекса у больных ГС и МГВС: пик кривой — среднее значение индекса; концы кривой — значения доверительных интервалов для индекса

Как видно из рисунка, значение индекса  $CD95^+/CD25^+$  у больных ХГС значительно превышало таковое у больных ОГС и МГВС ( $P < 0,05$ ). Оценивая доверительные интервалы данного индекса, предел («cut-off point»)  $CD95^+/CD25^+$  для прогноза течения заболевания составил 4,75 ( $P < 0,05$ ).

Увеличение индексов апоптоза также ассоциировалось со степенью тяжести и клинико-биохимической степенью активности заболевания: высокие значения индексов чаще наблюдались у больных ОГС с легкой формой тяжести (кроме  $CD95^+/CD11b^+$ ), а при ХГС и МГВС – с высокой активностью и тяжелой формой. Индекс  $CD95^+/CD25^+$  характеризовался более высокой диагностической и прогностической значимостью для прогноза (диагностики) тяжести или клинико-биохимической активности заболевания по сравнению с другими рассчитываемыми индексами («cut-off point» равна 2,99 при чувствительности — 0,75 и специфичности — 0,59; прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов — соответственно 58 и 38 %).

Установлена взаимосвязь иммунофенотипических показателей МПК больных ГС и МГВС со степенью тяжести и клинико-биохимической степенью активности заболевания. У больных ОГС выявлена достоверная взаимосвязь между среднетяжелой/тяжелой формой заболевания и Т-клеточным дефицитом, сопровождающимся нарушением баланса иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов (снижение ИРИ,  $P < 0,05$ ). С повышением степени тяжести заболевания отмечалась тенденция к увеличению содержания  $CD16^+$ -клеток. Экспрессия молекул адгезии ( $CD11b$ ), маркеров поздней активации (HLA-DR) и апоптоза ( $CD95$ ) на МПК при ОГС была достоверно повышена у больных всех групп ( $P < 0,05$ ) и нарастала по мере утяжеления течения заболевания. У больных МГВС была выявлена аналогичная взаимосвязь. Следует отметить, что у больных тяжелой формой МГВС наблюдались наиболее выраженные нарушения процессов иммунорегуляции и функционального состояния ИКК по сравнению с легкой ( $P < 0,05$ ) и среднетяжелой формой ( $P > 0,05$ ).

Анализ иммунофенотипических показателей МПК у больных ХГС в зависимости от клинико-биохимической степени активности заболевания выявил снижение  $CD3^+$  и  $CD4^+$ Т-клеток ( $P < 0,05$ ) и показателя ИРИ ( $P < 0,05$ ) у больных с минимальной степенью активности заболевания, свидетельствуя о существенном нарушении иммунорегуляторных процессов у данной категории больных. Количество  $CD16^+$ -клеток было также значительно снижено у больных с минимальной активностью ХГС ( $P < 0,05$ ), но по мере нарастания степени активности увеличивалось и достоверно отличалось в группе с высокой степенью активности по сравнению с группой, где она была минимальной ( $P < 0,05$ ). Аналогичная тенденция отмечалась в отношении экспрессии маркеров адгезии ( $CD11b$ ), активации ( $CD25$ , HLA-DR) и апоптоза ( $CD95$ ).

Через 2 недели после начала интерферонотерапии (ИФТ) у 10 больных ХГС отмечалась нормализация содержания  $CD3^+$ -,  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ Т-лимфоцитов

и их баланса (увеличение ИРИ до контрольного значения,  $P > 0,05$ ). Функциональное состояние МПК характеризовалось повышенной экспрессией маркеров адгезии и активации независимо от ИФТ, но имелась тенденция к их снижению до значений контрольной группы ( $P > 0,05$ ). Экспрессия CD95 была увеличена и значительно возросла на фоне ИФТ (с  $30,95 \pm 5,52$  % до  $54,54 \pm 6,12$  %;  $P < 0,05$ ). У 4 больных во время лечения наблюдалась положительная динамика клинико-биохимических показателей.

### **Функциональная характеристика Т-системы лимфоцитов больных ГС и МГВС *in vitro* и *in vivo***

Способность к пролиферации МПК больных ОГС и ХГС на РРД и ФГА значительно уступала показателям контрольной группы ( $P < 0,05$ ). У больных ОГС пролиферативный ответ МПК снижался по мере утяжеления заболевания и был минимальным при тяжелых формах по сравнению с легкой формой ОГС ( $P < 0,05$ ). Существенное угнетение пролиферативной активности при поступлении в стационар и через 2 недели лечения ( $P < 0,05$ ) сменялось незначительной её активацией при выписке. У больных ХГС пролиферативный ответ МПК практически не зависел от клинико-биохимической степени активности заболевания. Проводимая терапия, в том числе ИФТ, в течение двух недель у больных ОГС и ХГС не оказала существенного влияния на пролиферативную активность МПК на ФГА и РРД ( $P > 0,05$ ).

У больных ОГС, независимо от уровня угнетения пролиферативной активности МПК на различные типы стимуляторов, отсутствовали значимые изменения в экспрессии маркеров адгезии, активации и апоптоза. При ХГС наблюдались разнонаправленные изменения экспрессии маркеров активации и апоптоза на МПК в зависимости от уровня пролиферативной активности: повышенный уровень экспрессии CD25 и относительно низкий уровень экспрессии CD95 ассоциировались с минимально сниженной пролиферацией МПК на РРД и ФГА, а увеличение экспрессии CD95 выявлялось независимо от уровня пролиферации и типа стимулятора.

У больных ОГС и ХГС установлено снижение цитотоксической активности МПК по сравнению с контрольной группой ( $225,14 \pm 47,21$  и  $205,04 \pm 52,70$  против  $431,25 \pm 15,86$  соответственно,  $P < 0,05$ ). В ходе лечения происходило увеличение доли больных со средними (с 50 до 63 %) и высокими (с 14 до 37 %) индексами цитотоксической активности МПК за счет уменьшения количества больных с низкими индексами (с 36 до 0 %,  $P < 0,05$ ). К моменту выписки цитотоксическая активность при ОГС и ХГС повышалась и достигала контрольных значений.

При оценке функционирования Т-системы иммунитета при различных формах ГС *in vivo* установлено снижение кожного ответа на РРД у больных ОГС и ХГС по сравнению с таковым у практически здоровых лиц ( $2,8 \pm 0,77$  мм и  $3,61 \pm 0,87$  мм против  $9,3 \pm 1,03$  мм соответственно,  $P < 0,05$ ). Состояние анергии

выявлено у 70 % больных ОГС и 61,5 % — ХГС. Снижение кожного ответа на РРД при ОГС наблюдалось как в группе больных с анергией, так и с нормергией ( $1,43 \pm 0,43$  мм и  $6,0 \pm 0,57$  мм против  $9,3 \pm 1,03$  мм в контроле,  $P < 0,05$ ). У больных ХГС аналогичная ситуация отмечалась только в группе с анергией ( $P < 0,05$ ).

В культуре МПК у больных различными формами ГС выявлены значимые изменения продукции иммунорегуляторных цитокинов Th1/Th2-спектра: значительное снижение спонтанной продукции ИФН- $\gamma$  и повышение — ИЛ-4. Соотношение ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 у больных ОГС и ХГС было значительно снижено по сравнению с таковым в контрольной группе ( $5,64 \pm 1,93$  и  $7,59 \pm 2,74$  против  $33,80 \pm 8,63$  соответственно;  $P < 0,05$ ). В ФГА-стимулированной культуре мононуклеаров отмечалась аналогичная тенденция. Это свидетельствует о нарушении баланса продукции иммунорегуляторных цитокинов в сторону Th2-типа.

Установлено значительное увеличение концентрации общего IgE в сыворотке крови больных ГС и МГВС, особенно при ОГС ( $526,8 \pm 119,4$  МЕ/мл против  $95,3 \pm 10,3$  МЕ/мл в контрольной группе,  $P < 0,05$ ), хотя повышенный уровень IgE встречался чаще у больных МГВС (81,8 %). Повышение концентрации общего IgE при различных формах ГС и МГВС ассоциировалось со значительным снижением содержания CD3<sup>+</sup>T-лимфоцитов ( $P < 0,05$ , кроме ОГС) и дисбалансом их иммунорегуляторных субпопуляций ( $P < 0,05$ ). Снижение CD4<sup>+</sup>T-клеток и увеличение CD8<sup>+</sup>T-клеток ( $P < 0,05$ , кроме ОГС) приводило к значительному снижению ИРИ в группе больных с высоким уровнем общего IgE ( $> 200$  МЕ/мл) по сравнению с таковым в группе контроля и группе с низким уровнем общего IgE ( $< 200$  МЕ/мл) ( $P < 0,05$ ). Следует отметить, что при повышении уровня общего IgE имела место тенденция к увеличению содержания CD20<sup>+</sup>B-лимфоцитов ( $P < 0,1$ ). Экспрессия маркеров активации и апоптоза была повышена независимо от уровня IgE. Таким образом, установлена клиническая значимость определения концентрации общего IgE для оценки дисбаланса иммунорегуляторных субпопуляций T-клеток при ГС и МГВС: точка диагностической значимости («cut-off point») общего IgE равна 199,2 МЕ/мл при чувствительности — 0,78 и специфичности — 0,68. Прогностическая ценность положительного результата (IgE  $> 199,2$  МЕ/мл) составила 75 %, а отрицательного результата (IgE  $< 199,2$  МЕ/мл) — только 28 % ( $P < 0,001$ ).

Концентрация анти-C1q-аутоантител в сыворотке крови больных ОГС, ХГС и МГВС была значительно увеличена ( $8,39 \pm 2,85$  МЕ/мл,  $10,72 \pm 2,64$  МЕ/мл и  $27,75 \pm 6,43$  МЕ/мл против  $4,92 \pm 1,69$  МЕ/мл в контроле,  $P < 0,05$ ). При ХГС и МГВС повышенный уровень анти-C1q-аутоантител выявлялся чаще (52,6 и 81,3 % соответственно). В последнем случае он был максимальным и достоверно отличался от такового у больных ОГС и ХГС ( $P < 0,05$ ). При высоком уровне анти-C1q-аутоантител ( $> 5$  МЕ/мл) выявлены снижение содержания CD3<sup>+</sup>T-лимфоцитов ( $P < 0,05$ ) и дисбаланс их субпопуляций (снижение ИРИ за счет содер-

жания CD4<sup>+</sup>-клеток,  $P < 0,05$ ), а также тенденции к снижению содержания CD16<sup>+</sup>-клеток ( $P > 0,05$ ) и увеличению содержания CD20<sup>+</sup>B-лимфоцитов ( $P > 0,05$ ). Экспрессия маркеров активации была значительно увеличена ( $P < 0,05$ ) независимо от уровня анти-C1q-аутоантител, а экспрессия рецептора апоптоза (CD95) уменьшалась с увеличением их концентрации. Ассоциация между дисбалансом CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов и высоким уровнем анти-C1q-ауто-антител свидетельствует о диагностической значимости определения уровня анти-C1q-ауто-антител при ГС и МГВС для оценки дисбаланса иммунорегуляторных субпопуляций T-лимфоцитов: «cut-off point» уровня анти-C1q-аутоантител — 7,16 МЕ/мл при чувствительности — 0,65 и специфичности — 0,44. Прогностическая ценность при уровне анти-C1q-аутоантител  $> 7,16$  МЕ/мл составила 57 %, а при отрицательном результате — 47 % ( $P > 0,05$ ).

### **Влияние индукторов цАМФ (ТФ, дбцАМФ) на функциональное состояние Т-системы иммунитета больных ГС (*in vitro* и *in vivo*)**

Добавление ТФ в терапевтической дозе (15 мкг/мл) практически не изменяло пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови доноров и оказывало модулирующий эффект у больных ГС ( $P < 0,05$ ). Так, у больных ОГС и ХГС введение ТФ способствовало увеличению пролиферативной активности МПК по сравнению с базовой пролиферацией в контрольной группе и при различных формах ГС ( $8,22 \pm 2,11$  и  $7,95 \pm 1,54$  против  $3,72 \pm 0,28$ ,  $1,92 \pm 0,20$  и  $1,72 \pm 0,18$ ;  $P < 0,05$ ), что указывает на отмену им угнетенного пролиферативного ответа МПК и обосновывает наличие иммуномодулирующего действия ТФ на функциональную активность ИКК. Добавление ТФ совместно с ФГА при ОГС и ХГС не приводило к дальнейшему увеличению пролиферативной активности МПК, а способствовало её нормализации до контрольных значений ( $41,67 \pm 4,19$  и  $32,63 \pm 3,12$  против  $29,88 \pm 4,68$ ;  $P > 0,05$ ), что также свидетельствует о его иммуномодулирующем действии, обусловленном регуляцией функций клеток, опосредующих клеточный иммунный ответ у больных ОГС и ХГС.

Несмотря на значительное снижение продукции ИФН- $\gamma$  у больных ГС, индукторы цАМФ не изменяли его продукцию. В тоже время введение ТФ совместно с ФГА способствовало оптимизации активности клеточного иммунитета при ОГС и ХГС за счет коррекции продукции данного цитокина до значений контрольной группы ( $393,0 \pm 36,1$  пг/мл и  $461,6 \pm 59,3$  пг/мл против  $556,3 \pm 94,02$  пг/мл;  $P > 0,05$ ), что указывает на слабое иммуномодулирующее влияние ТФ на продукцию ИФН- $\gamma$  при различных формах ГС. Индукторы цАМФ как самостоятельно, так и в тестах с ФГА, не оказали существенного влияния на секрецию ИЛ-4 в контрольной группе ( $P > 0,05$ ). При ГС, особенно у больных ХГС, использование индукторов цАМФ обусловило значительное снижение повышенного уровня секреции ИЛ-4 до уровня базовой продукции ( $с 5,69 \pm 1,27$  пг/мл до  $2,75 \pm 0,49$  пг/мл,  $P < 0,05$ ). При одновременном воздействии ФГА и индукторов цАМФ наблюдалась аналогичная ситуация, что свидетельствует об иммуномо-

дулирующем действии ТФ в отношении ИЛ-4. Анализ сочетанной продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 (расчет индекса ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4) показал, что при ГС, особенно при ХГС, ТФ как самостоятельно, так и в тестах с ФГА повышал значения индекса до значений контрольной группы ( $P > 0,05$ ), подтверждая тем самым наличие иммуномодулирующего действия на продукцию цитокинов Th1/Th2-спектра. Способность ТФ приводить к нормализации баланса иммунорегуляторных процессов обосновывает возможность его использования для иммунотерапии больных ХГС.

В двойных кожных тестах введение ТФ в терапевтической дозе (15 мкг/мл) практически не изменяло кожный ответ на Т-клеточный антиген (PPD) в группе контроля ( $P > 0,05$ ), но значительно увеличило сниженную реактивность Т-системы иммунитета у больных ГС (табл. 3).

Таблица 3

**Результаты кожных тестов с PPD и ТФ у больных ГС (мм)**

Вид реакции	Больные ОГС (n=12)		Больные ХГС (n=18)	
	PPD	PPD+ТФ	PPD	PPD+ТФ
Нормергия	6,0 ± 0,57	9,16 ± 0,44*	7,8 ± 1,62	7,6 ± 1,63
Анергия	1,43 ± 0,43	1,66 ± 0,33	1,5 ± 0,42	2,83 ± 0,47*

*Примечание:* \* различия с кожным ответом на PPD достоверны при  $P < 0,05$ .

У больных ОГС с нормергией введение ТФ с туберкулином привело к значительному повышению кожного ответа по сравнению с ответом на введение только PPD ( $P < 0,05$ ) и достигло значений контрольной группы ( $9,3 \pm 1,03$  мм). В группе с анергией наблюдалась тенденция к незначительному повышению кожного ответа на совместное введение PPD и ТФ ( $P > 0,05$ ). Эффект ТФ у больных ХГС имел обратную направленность: кожный ответ на PPD при нормергии не изменялся на введение ТФ ( $P > 0,05$ ), а в случаях с анергией ТФ обладал стимулирующим эффектом, вызывая значительное повышение ответа на PPD ( $P < 0,05$ ).



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У больных ГС и МГВС выявлены существенные изменения количественных и фенотипических характеристик МПК: дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов ( $\alpha\beta^+/\gamma\delta^+$ Т-клеток,  $CD4^+/CD8^+$ Т-клеток), снижение содержания  $CD3^+$ - и  $CD16^+$ -клеток (кроме ОГС), экспрессии  $CD28$ -молекулы и повышение экспрессии молекул адгезии ( $CD11b$ ), активации ( $CD25$ ,  $HLA-DR$ ) и апоптоза ( $CD95$ ), что свидетельствует о нарушении молекулярно-клеточных механизмов активации/костимуляции и регуляции Т-системы лимфоцитов с развитием негативной и/или «неправильной» активации ИКК, определяющих клиническое течение гепатитов. На фоне интерферонотерапии у больных ХГС нормализуется количество Т-лимфоцитов и соотношение их субпопуляций, а также наблюдается активация ИКК с повышенной экспрессией рецептора апоптоза ( $CD95$ ) [2, 5, 6, 8, 12, 13, 15, 16, 23].

2. Впервые при ГС и МГВС предложены индексы активации ( $CD11b^+/CD25^+$ ,  $CD11b^+/HLA-DR^+$ ,  $CD25^+/HLA-DR^+$ ) и апоптоза ( $CD95^+/CD25^+$ ,  $CD95^+/HLA-DR^+$ ,  $CD95^+/CD11b^+$ ), которые позволяют оценить функциональное состояние Т-системы иммунитета и течение заболевания. Установлено достоверное увеличение индексов  $CD11b^+/CD25^+$ ,  $CD11b^+/HLA-DR^+$  и снижение индекса  $CD25^+/HLA-DR^+$ , а также увеличение индексов апоптоза у больных ГС и МГВС. Высокие значения индексов апоптоза в 61 % случаев ОГС ассоциировались с легкой формой тяжести (кроме  $CD95^+/CD11b^+$ ), в 66 % — ХГС с высокой активностью и в 71,4 % — МГВС с тяжелым течением заболевания. Индекс  $CD95^+/CD25^+$  имеет более высокую клиническую значимость для оценки тяжести или клинико-биохимической активности процесса по сравнению с другими индексами апоптоза («cut-off point» равна 2,99 при чувствительности — 0,75 и специфичности — 0,59, прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов — 58 и 38 %) [2, 26, 27].

3. У больных ГС и МГВС выявлены разнонаправленные изменения иммунофенотипических показателей МПК в зависимости от степени тяжести и клинико-биохимической активности заболевания. Приобретенный Т-клеточный иммунодефицит (снижение  $CD3^+$ Т-лимфоцитов, дисбаланс иммунорегуляторных субпопуляций и повышение экспрессии маркеров адгезии, активации и апоптоза на МПК) и увеличение количества естественных киллеров у больных ОГС и МГВС сочетались со среднетяжелой и тяжелой формой заболевания. У больных тяжелой формой МГВС наблюдались наиболее выраженные нарушения процессов иммунорегуляции и функционального состояния ИКК по сравнению с легкой ( $P < 0,05$ ) и среднетяжелой формой ( $P > 0,05$ ). Аналогичные изменения в иммунофенотипических показателях МПК у больных ХГС отмечались при минимальной степени активности заболевания, но увеличение показателей экспрессии маркеров адгезии, активации и апоптоза, а также содержания

естественных киллеров сопровождалось повышением степени активности инфекционного процесса [19, 20].

4. У больных ГС *in vitro* и *in vivo* выявлены функциональные нарушения Т-клеточного иммунитета — снижение пролиферативной и цитотоксической активности МПК ( $P < 0,05$ ), угнетение внутрикожного ответа на анамнестический антиген (туберкулин) ( $P < 0,05$ ), что свидетельствует о формировании анергии Т-системы иммунитета. Состояние анергии подтверждается низкой спонтанной и стимулированной продукцией ИФН- $\gamma$  ( $P < 0,05$ ) в культуре МПК на фоне повышенной спонтанной и стимулированной продукции ИЛ-4 ( $P < 0,05$ ), снижением соотношения ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 у больных ОГС и ХГС ( $5,64 \pm 1,93$  и  $7,59 \pm 2,74$  против  $33,80 \pm 8,63$  в контроле;  $P < 0,05$ ), что указывает на дисбаланс иммунорегуляторных цитокинов, продуцируемых  $CD4^+$ Th1- и  $CD4^+$ Th2-клетками [7, 9, 11, 14, 25].

5. В сыворотке крови больных ГС и МГВС установлено увеличение содержания общего IgE (76 % случаев) и анти-C1q-аутоантител (66 % случаев). Впервые обоснована клиническая (диагностическая и прогностическая) значимость определения концентрации общего IgE («cut-off point» равна 199,2 МЕ/мл при чувствительности — 0,78 и специфичности — 0,68; прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов — 75 и 28 %,  $P < 0,001$ ) и анти-C1q-аутоантител («cut-off point» — 7,16 МЕ/мл при чувствительности — 0,65 и специфичности — 0,44; прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов — 57 и 47 %,  $P > 0,05$ ) для оценки дисбаланса иммунорегуляторных субпопуляций Т-клеток при ГС и МГВС, что подтверждает роль IgE- и комплемент-зависимых воспалительных и аутоиммунных процессов в их патогенезе [10, 17, 18, 21, 22, 28, 29].

6. У больных ГС выявлено иммуномодулирующее действие индукторов цАМФ (теофиллин и дибутирил цАМФ) на пролиферативную активность МПК и баланс продуцируемых ими цитокинов *in vitro* (повышение ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 до значений контрольной группы;  $P > 0,05$ ), восстановление функции  $CD4^+$ Th1-клеток и, соответственно, механизмов гиперчувствительности замедленного типа *in vivo* (увеличение кожного ответа на РРД до значений контроля;  $P > 0,05$ ) [1, 4, 24].

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах

1. Титов Л.П., Тарасюк В.В., Черношей Д.А. Теофиллин – регулятор функции иммунокомпетентных клеток и модулятор межклеточных взаимодействий // Рецепт. – 2003. – № 5(31). – С. 78–81.
2. Тарасюк В.В., Титов Л.П. Клеточно-молекулярные маркеры повреждения Т-системы иммунитета при различных формах вирусного гепатита // Здоровоохранение. – 2005. – № 8. – С. 55–58.
3. Тарасюк В.В. Клиническое значение исследования концентрации IgE сыворотки крови больных различными формами вирусного гепатита С и микст-гепатитом В+С // Медицинский журнал. – 2006. – №1(15). – С. 91–93.
4. Тарасюк В.В., Титов Л.П., Черношей Д.А., Жмуровская Л.С. Влияние теофиллина на иммунитет больных вирусным гепатитом С // Рецепт. – 2006. – №3(47). – С. 145–150.

### Статьи в сборниках научных трудов

5. Тарасюк В.В., Черношей Д.А. Иммунофенотип мононуклеаров периферической крови при вирусном гепатите С в зависимости от формы процесса и экспрессии маркера апоптоза CD95+ // Труды молодых ученых, юбил. изд., сб. науч. работ / БГМУ; Под общ. ред. проф. С.Л.Кабака. – Минск, 2001. – С. 144–147.
6. Черношей Д.А., Тарасюк В.В., Жмуровская Л.С., Кондрачук А.Н., Титов Л.П. Иммунофенотип мононуклеаров периферической крови при парентеральных гепатитах В и С // Современные проблемы инфекционной патологии человека (вирусология, микробиология, иммунология, эпидемиология, клиника): Материалы 2-й Науч.-практ. конф. по итогам выполнения ГНТП «Инфекционные болезни» 1998–2000 г., Минск, 18 января 2001 г. – Минск, 2001. – С. 341–345.
7. Тарасюк В.В., Черношей Д.А., Титов Л.П., Жмуровская Л.С. Пролиферативная активность мононуклеаров периферической крови больных вирусным гепатитом С // Актуальные вопросы современной медицины: Материалы Юбил. науч. конф., посвящ. 80-летию БГМУ / БГМУ; Под общ. ред. проф. С.Л.Кабака. – Минск, 2001. – Ч. 2. – С. 178–180.
8. Жмуровская Л.С., Титов Л.П., Тарасюк В.В., Черношей Д.А., Ключарева А.А., Казак В.Е. Характеристика иммунного статуса у наркопотребителей с острыми формами вирусного гепатита В, С и микст-гепатитом // Эпидемиология, диагностика, патогенез, лечение и профилактика инфекционных заболеваний: Материалы Респ. науч.-практ. конф. инфекционистов и эпидемиологов, Гомель, 13–13 декабря 2001 г. – Мозырь: Белый ветер, 2001. – С. 113–116.

9. Тарасюк В.В. Цитотоксическая активность мононуклеаров периферической крови при парентеральных гепатитах // Эпидемиология, диагностика, патогенез, лечение и профилактика инфекционных заболеваний: Материалы Респ. науч.-практ. конф. инфекционистов и эпидемиологов, Гомель, 13–13 дек. 2001 г. – Мозырь: Белый ветер, 2001. – С. 304–308.

10. Перегуд И.А., Титова И.П., Козыро И.А., Хидченко С.В., Тарасюк В.В., Титов Л.П. Аутоантитела к С1q компоненту системы комплемента у больных аутоиммунными заболеваниями и вирусными гепатитами В и С // Проблемы бактериологии и иммунологии: Материалы Юбил. науч. конф. (к 80-летию кафедры микробиол., вирусол., иммунол. БГМУ), Минск, 6 февр. 2004 г. / БГМУ; Под ред. проф. Л.П.Титова. – Минск, 2005. – С. 99–103.

### **Тезисы докладов на конференциях**

11. Charnashey D.A., Tarasiuk V.V., Jmurovskaya L.S., Titov L.P. IL-2 dependent intraskin response in patients with viral hepatitis // Progress in gastroenterology and hepatology: Cytokines in liver injury and repair: Falk Symposium N 125, Hannover, Germany, September 30-October 1, 2001: Abstr. (part II) – Hannover, 2001. – P. 20.

12. Titov L.P., Tarasiuk V.V., Charnashey D.A., Jmurovskaya L.S. Dynamics of mononuclears immunophenotype in hepatitis C patients during interferon treatment // Progress in gastroenterology and hepatology: Cytokines in liver injury and repair: Falk Symposium N 125, Hannover, Germany, September 30-October 1, 2001: Abstr. (part II) – Hannover, 2001. – P. 96.

13. Тарасюк В.В., Черношей Д.А., Жмуровская Л.С., Титов Л.П. Экспрессия адгезивных и активационных маркеров мононуклеаров периферической крови при вирусном гепатите С // Дни иммунологии в Санкт-Петербурге: 6-я Всерос. науч. конф. с междунар. участием, Санкт-Петербург, Россия, 20–23 мая 2002 г. / Медицинская иммунология. – 2002, Т. 4, № 2. – С. 261.

14. Tarasiuk V.V., Charnashey D.A., Jmurovskaya L.S., Titov L.P. NK-cells activity in parenteral hepatitis // Interactions between innate and adaptive immunity in mammalian defense against bacterial infections: Euroconference, Goehren-Lebben, Germany, June 5–8, 2002: Book of abstr. – Goehren-Lebben, 2002. – P. 29.

15. Charnashey D., Tarasiuk V., Jmurovskaya L., Titov L. Peripheral blood lymphocytes immunophenotype in mixed hepatitis B+C // Joint Meet. of the 3 divisions of Intern. Union of Microbiol. Soc. (World Congr.): 12th Intern. Congr. Virology, Paris, France, July 27-August 1, 2002: Abstracts. – Paris, 2002. – P. 320.

16. Tarasiuk V., Charnashey D., Jmurovskaya L., Titov L. Expression of CD-antigens on peripheral blood lymphocytes in patients with viral hepatitis C // Joint Meet. of the 3 divisions of Intern. Union of Microbiol. Soc. (World Congr.): 12th Intern. Congr. Virology, Paris, France, July 27-August 1, 2002: Abstracts. – Paris, 2002. – P. 321.

17. Tarasiuk V.V., Peregud Y.A., Charnashey D.A., Sadallah S., Schifferli J., Titov L.P. Anti-C1q-autoantibodies in patients with viral hepatitis C and mixed hepatitis B+C: possible role // 22nd Congr. of the Eur. Acad. Allergol. Clin. Immunol., Paris, France, June 7–11, 2003: Abstr. book. – Paris, 2003. – P. 311 (1082).

18. Titov L.P., Tarasiuk V.V., Peregud Y.A., Charnashey D.A., Sadallah S., DuBuske L.M., Schifferli J. Anti-C1q-autoantibodies in patients with viral hepatitis // World Allergy Congr. – 18<sup>th</sup> ICACI, Vancouver, Canada, September 7–12, 2003. – Allergy Clin. Immunol. Int: J. World Allergy Org. – 2003. – Suppl. 1. – P. 101–102 (P-7–26).

19. Charnashey D., Tarasiuk V., Jmurovskaya L., Titov L. Immunological and biochemical indexes in patients with chronic hepatitis C during interferon treatment // Alergologijos Žinios. – Nr.3(6). – Vilnius, 2003. – P. 33.

20. Tarasiuk V., Charnashey D., Jmurovskaya L., Titov L. Interrelation between immunophenotype of peripheral blood mononuclear cells and AAT activity in patients with acute and chronic hepatitis C // Alergologijos Žinios. – Nr.3 (6). – Vilnius, 2003. – P. 33–34.

21. Tarasiuk U.V., Titov L.P., Charnashey D.A., Perahud I.A., Jmurovskaya L.S., DuBuske L.M., Sadallah S., Schifferli J. Peripheral blood lymphocyte immunophenotype and serum level of anti-C1q-autoantibodies in patients with hepatitis C and mixed hepatitis B+C // ACAAI Ann. Meeting Amer. College of Allergy, Asthma and Immunology, New Orleans, USA, November 7–12, 2003: Abstr. book. – New Orleans, 2003. – P. 48–49.

22. Titov L.P., Tarasiuk U.V., Charnashey D.A., DuBuske L.M. The concentration of serum total IgE in patients with viral hepatitis as the marker of CD4<sup>+</sup>T cell subpopulations // 2004 Ann. Meeting Amer. College of Allergy, Asthma and Immunology, Boston, USA, November 13–17, 2004: Abstr. book. – Boston, 2004. – P. 31–32.

23. Titov L., Tarasiuk U.V., Charnashey D.A., Jmurovskaya L.S., DuBuske L.M. TCR and CD28 expression in patients with chronic hepatitis B and C // AAAAI 61st Ann. Meet., San Antonio, Texas, March 18–22, 2005. – J. Allergy and Clin. Immunol. – 2005. – Vol. 115, N. 2 (Suppl.) – P. S17 (67).

24. Tarasiuk V.V., Titov L.P., Charnashey D.A., Jmurovskaya L.S., DuBuske L.M. The effect of cAMP induction on IFN-gamma and IL4 production by peripheral blood mononuclear cells from viral hepatitis patients // World Allergy Congress (19th WAO Congr. and 24th EAACI), Munich, Germany, June 26–July 1, 2005. – Allergy Clin. Immunol. Int: J. World Allergy Org. – 2005. – Suppl. 1. – P. 42 (1176).

25. Titov L.P., Tarasiuk U.V., Charnashey D.A., Zhmurovskaya L.S. Correlation between Th1/Th2 cytokines production and proliferate activity of peripheral blood mononuclears in patients with viral hepatitis B and C // World Congress of Gastroenterology: 7th Intern. Symp. on Cytokines and Chemokines, Montreal, Quebec, Canada, September 8–9, 2005: Abstr. book. – Montreal, 2005. – P. 78–79.

26. Тарасюк В.В., Титов Л.П., Жмуровская Л.С. Методы диагностики клеточно-молекулярных повреждений Т-системы иммунитета при вирусном гепатите С и микст-гепатите В+С // Достижения медицинской науки Беларуси: Ред. науч.-практ. ежегодник. – Минск: ГУ РНМБ, 2005. – Вып. 10. – С. 45–46.

27. Tarasiuk V.V., Titov L.P., Charnashey D.A., Jmurovskaya L.S., DuBuske L.M. Apoptosis indices in patients with acute and chronic viral hepatitis C and mixed hepatitis B and C // AAAAI 62st Ann. Meet., Miami Beach, Florida, March 3–7, 2006. – J. Aller. and Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 117, N. 2 (Suppl.) – Miami Beach, Florida, 2006. – P. S207 (797).

28. Titov L.P., Tarasiuk U.V., Charnashey D.A., Peregud Y.A., Jmurovskaya L.S., DuBuske L.M., Sadallah S., Schifferli J. Diagnostic and prognostic importance of serum anti-C1q-autoantibody production in patients with viral hepatitis C and viral mixed hepatitis B and C // Ann. Meet. Fed. Clin. Immunol. Soc., San Francisco, USA, 2006. – J. Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 119, Suppl. – San Francisco, 2006. – P. S179–S180 (Su.57).

29. Titov L., Tarasiuk U., Charnashey D., Jmurovskaya L., DuBuske L. Diagnostic and prognostic importance of total serum IgE level in patients having viral hepatitis C and mixed viral hepatitis B and C // 25th Congr. Europ. Acad. Aller. Clin. Immunol., Vienna, Austria, 2006: Abstr. book. – Vienna, 2006. – P. 438 (1604).

Тарасюк Уладзімір Васільевіч

**Стан рэгуляторных і эфектарных механізмаў Т-сістэмы імунітэту ў хворых на вірусны гепатыт С і мікст-гепатыт В+С**

**Ключавыя словы:** вірусны гепатыт С (ГС), мікст-гепатыт В+С (МГВС), Т-сістэма імунітэту, метады імунадыягностыкі, імунакарэкцыя, індуктары цАМФ, тэафілін.

**Аб'ект даследавання:** монануклеары перыферычнай крыві (МПК) і сываратка 80 хворых на ГС і 24 хворых на МГВС.

**Мэта даследавання:** вывучыць малекулярна-клетачныя механізмы функцыянавання Т-сістэмы імунітэту ў хворых на ГС і МГВС і на гэтай аснове распрацаваць метады дыягностыкі імуналагічных парушэнняў і вызначыць падыходы да іх імунакарэкцыі.

**Метады даследавання:** клініка-лабараторныя, імуналагічныя, статыстычныя.

**Атрыманыя вынікі і іх навуковая навізна:** дадзена колькасная і функцыянальная ацэнка стану Т-сістэмы імунітэту ў хворых на ГС і МГВС. Вызначаны Т-клетачны дэфіцыт і дысбаланс  $CD4^+$ - і  $CD8^+$ -субпапуляцый на фоне парушэння іх актывацыйна-праліфератыўных механізмаў са значнай экспрэсіяй рэцэптара апаптозу. Упершыню прапанаваны разлік індэксаў суадносін экспрэсіі маркёраў адгезіі, актывацыі і апаптозу на МПК — індэксаў актывацыі ( $CD11b^+/CD25^+$ ,  $CD11b^+/HLA-DR^+$ ,  $CD25^+/HLA-DR^+$ ) і апаптозу ( $CD95^+/CD11b^+$ ,  $CD95^+/CD25^+$ ,  $CD95^+/HLA-DR^+$ ) — для аб'ектыўнай ацэнкі функцыі Т-сістэмы імунітэту пры ГС і МГВС. Устаноўлена парушэнне экспрэсіі кастымуляцыйнай малекулы CD28 і Т-клетачнага рэцэптара  $\gamma\delta$ -тыпу на МПК і колькасная і функцыянальная недастатковасць натуральных кілераў у хворых на ГС і МГВС. У даследаваннях *in vivo* ўпершыню абгрунтавана наяўнасць стану анэргіі імуннай сістэмы пры ГС. Атрыманы даныя аб ролі IgE-залежных запаленчых і аўтаімуных (прысутнасць анці-С1q-аўтаантыцел) працэсаў у патагенезе вірусных гепатытаў. Упершыню ў даследаваннях *in vitro* і *in vivo* вызначаны імунамадулюючы эфект індуктараў цАМФ на функцыю МПК хворых на ГС. Абгрунтавана ўжыванне прэпарата тэафіліна ў якасці імунамадулятара ў комплекснай тэрапіі хворых на хронічны гепатыт С.

**Рэкамендацыі па выкарыстанню:** для імунадыягностыкі і імунаатэрапіі хворых на вірусныя гепатыты, у навучальным працэсе.

**Галіны выкарыстання:** імуналогія, інфекцыйная гепаталогія.

## РЕЗЮМЕ

Тарасюк Владимир Васильевич

**Состояние регуляторных и эффекторных механизмов Т-системы иммунитета у больных вирусным гепатитом С и микст-гепатитом В+С**

**Ключевые слова:** вирусный гепатит С (ГС), микст-гепатит В+С (МГВС), Т-система иммунитета, методы иммунодиагностики, иммунокоррекция, индукторы цАМФ, теofilлин.

**Объект исследования:** мононуклеары периферической крови (МПК) и сыворотка 80 больных ГС и 24 больных МГВС.

**Цель настоящего исследования:** изучить молекулярно-клеточные механизмы функционирования Т-системы иммунитета у больных ГС и МГВС и на этой основе разработать методы диагностики иммунологических нарушений и определить подходы к их иммунокоррекции.

**Методы исследования:** клинико-лабораторные, иммунологические, статистические.

**Полученные результаты:** дана количественная и функциональная оценка состояния Т-системы иммунитета у больных ГС и МГВС. Выявлены Т-клеточный дефицит и дисбаланс  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -субпопуляций на фоне нарушения их активационно-пролиферативных механизмов со значительной экспрессией рецептора апоптоза. Впервые предложен расчет соотношений экспрессии маркеров адгезии, активации и апоптоза на МПК — индексов активации ( $CD11b^+/CD25^+$ ,  $CD11b^+/HLA-DR^+$ ,  $CD25^+/HLA-DR^+$ ) и апоптоза ( $CD95^+/CD11b^+$ ,  $CD95^+/CD25^+$ ,  $CD95^+/HLA-DR^+$ ) — для объективной оценки функции Т-системы иммунитета при ГС и МГВС. Установлены нарушение экспрессии костимуляторной молекулы CD28 и Т-клеточного рецептора  $\gamma\delta$ -типа на МПК больных ГС и МГВС, количественная и функциональная недостаточность естественных киллеров. В исследованиях *in vivo* впервые обосновано наличие состояния анергии иммунной системы при ГС. Получены данные о роли IgE-зависимых воспалительных и аутоиммунных (наличие анти-C1q-аутоантител) процессов в патогенезе вирусных гепатитов. Впервые в исследованиях *in vitro* и *in vivo* установлен иммуномодулирующий эффект индукторов цАМФ на функцию МПК больных ГС. Обосновано использование препарата теofilлина в качестве иммуномодулятора в комплексной терапии больных хроническим гепатитом С.

**Рекомендации по использованию:** для иммунодиагностики и иммунотерапии больных вирусными гепатитами, в учебном процессе.

**Область применения:** иммунология, инфекционная гепатология.



## SUMMARY

**Tarasiuk Uladzimir Vasilievich**

### **Condition of regulatory and effector mechanisms of T-immunity system in patients with viral hepatitis C and mixed hepatitis B and C**

**Key words:** viral hepatitis C (HC), mixed hepatitis B and C (MHBC), T-immunity system, methods of immunodiagnostics, immunocorrection, cAMP inductors, theophylline.

**Object of investigation:** peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and blood serum from 80 patients with HC and 24 patients with MHBC.

**Aim of the investigation:** to study cellular and molecular mechanisms of function of T-immunity system in patients with HC and MHBC, and to develop the methods for immune disorders diagnostics and the approaches to their immunocorrection.

**Methods of investigation:** clinical, laboratory, immunological, statistical.

**Obtained results:** the quantitative and functional evaluation of T-immunity system condition in patients with HC and MHBC was carried out. T-cellular deficiency and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells imbalance were revealed on the background of activation and proliferate mechanisms impairment and significant expression of apoptosis receptor. For the first time diagnostic indices based on the ratio of adhesion, activation and apoptosis markers expression on PBMC — indices of activation (CD11b<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) and apoptosis (CD95<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) — were proposed for evaluation of T-immunity system function in patients with HC and MHBC. The impairment of costimulatory molecule CD28 and T-cell receptor  $\gamma\delta$  expression on PBMC, the quantitative and functional insufficiency of NK cells in patients with HC and MHBC were revealed. In *vivo* investigations demonstrated for the first time the presence of immune system anergy in HC. The role of IgE-dependent inflammatory and autoimmune processes (presence of anti-C1q-autoantibodies) in the pathogenesis of viral hepatitis were determined. For the first time in vitro and in vivo investigations revealed the immunomodulatory effect of cAMP inductors on function of PBMC in patients with HC. Theophylline preparation was substantiated as immunomodulator in complex therapy of patients with chronic hepatitis C.

**Recommendations for application:** for immunodiagnostics and immunotherapy of viral hepatitis, in educational process.

**Field of application:** immunology, infection hepatology.

Подписано в печать \_\_\_\_\_. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Кюм Люкс».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. \_\_\_\_\_ Уч.-изд. л. \_\_\_\_\_. Тираж \_\_\_\_\_ экз. Заказ \_\_\_\_\_.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусский государственный медицинский университет

ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.

220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 6.