

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.36-002-022-092:612.017.1]-078.33

**К.Т. Умбетова¹, Е.В. Волчкова¹, М.В. Киселевский², Ю.Г. Пархоменко³,
Л.И. Шуба¹, С.Г. Пак¹**

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОСНОВА АУТОИММУННЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПРИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТАХ

¹ГБОУ ВПО Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2; ²ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, стр. 15; ³клиническая инфекционная больница № 2, 105275, Москва, 8-я ул. Соколиной горы, 15

Цель исследования – изучить морфологическую основу внепеченочных поражений и аутоиммунных проявлений при хронических вирусных гепатитах. Методом непрямой иммунофлюоресценции определяли ASMA, AMA, ANA, методом иммуноферментного анализа – anti-LKM-1. Криоглобулины (КГ) выявлены качественным визуализационным методом, ревматоидный фактор (РФ) определялся в сыворотке полуколичественным методом латекс-агглютинации на слайде. Больным проводилась пункционная биопсия печени по Менгину с последующим гистологическим и морфологическим исследованием полученных биоптатов печени методом иммуногистохимии и иммуноцитохимии.

У больных хроническими вирусными гепатитами выявлены аутоиммунные проявления (РФ, КГ, ASMA, ANA, AMA, anti-LKM-1) с одинаковой частотой независимо от степени гистологической активности. В гепатобиоптате у больных хроническими вирусными гепатитами обнаружен комплекс Т регуляторных лимфоцитов (CD4⁺CD25⁺), который свидетельствует о наличии морфофункциональной основы для формирования аутоиммунных проявлений на фоне персистирующей вирусной инфекции.

Выявленные нами аутоиммунные проявления в сыворотке крови находят свое отражение в морфологических изменениях печеночной ткани, причем морфологические изменения, характерные для аутоиммунных гепатитов, наблюдаются в основном у больных хроническими вирусными гепатитами В и С с умеренной и высокой гистологической активностью.

Ключевые слова хронические вирусные гепатиты В и С, аутоиммунные проявления, комплекс Т-регуляторных клеток (CD4⁺CD25⁺)

K. T. Umbetova, E. V. Volchkova, M. V. Kiselevsky, Yu. G. Parkhomenko, L. I. Shuba, S. G. Pak

MORPHOLOGICAL BASIS OF AUTOIMMUNE MANIFESTATIONS IN VIRAL HEPATITISES

¹State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health care and Social Development, Moscow, Russian Federation, 8-2, Trubetskaya street, Moscow, Russia, 119991; ²Federal State Budgetary Institute N. N. Blokhin Cancer Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences, 24, Kashirskoye Shosse, Moscow, Russian Federation, 115478; ³State Treasury Institution of Healthcare "Infectious Clinical Hospital № 2" of the Moscow Department of Healthcare, 15, Vos'maya Ulitsa Sokolinoy gory, Moscow, Russian Federation, 105275

The purpose of the study - to study morphological basis of extrahepatic lesions and autoimmune manifestations in chronic viral hepatitis Methods of performance. By indirect immunofluorescence ASMA, AMA, ANA, by enzyme immunoassay - the Anti-LKM-1 were determined. Cryoglobulins (CG) have been revealed with the use of qualitative visualization method, rheumatoid factor (RF) was determined in serum by semiquantitative latex agglutination on a slide. Patients underwent liver biopsy. A puncture liver biopsy according to Mengini was performed with the subsequent histologic and morphological research of obtained liver biopsates with the use of an immunohistochemical and immunocytochemical methods.

Results. In patients with chronic viral hepatitis autoimmune manifestations (RF, CG, ASMA, ANA, AMA, anti-LKM-1) were identified at the same rate regardless of the degree of histological activity. In the liver biopsate in patients with chronic viral hepatitis the complex of regulatory T cells (CD4 + CD25 +), which indicates the presence of morphological and functional basis for the formation of autoimmune manifestations against persistent viral infection was detected.

Conclusion. Identified by ourselves autoimmune manifestations in the blood serum be embodied in the morphological changes of the liver tissue, at that the morphological changes characteristic of autoimmune hepatitis, are observed mainly in patients with chronic viral hepatitis B and C, with moderate and high histological activity.

Key words: chronic viral hepatitis B and C, autoimmune manifestations, complex of T-regulatory cells (CD4 + CD25 +)

В настоящее время является общепризнанным факт, что течение хронических вирусных гепатитов В и С зачастую протекает на фоне системных (внепеченочных)

проявлений в сочетании с широким спектром аутоантител [1, 5]. В то же время установлено, что природа развития внепеченочных поражений обусловлена иммунными реакциями, возникающими в ответ на репликацию вирусов в печени и вне ее [11], но морфологическая основа внепеченочных поражений и аутоиммунных проявлений при хронических вирусных гепатитах В и С на фоне репликативной

Для корреспонденции: Умбетова Карина Туракбаевна, д-р мед. наук, проф. каф. инфекционных болезней медико-профилактического фак. Первого МГМУ, e-mail: karinasara@inbox.ru

активности гепатотропных вирусов остается недостаточно изученной.

Известно, что прогрессирование вирусных инфекций ассоциируется со специфическими дефектами и дисбалансом в системе Th1- и Th2- типа [3, 9]. При формировании иммунного ответа по 2-му типу развивается персистенция вирусной инфекции с обязательным присутствием аутоиммунного компонента независимо от возбудителя [10]. Причиной развития аутоиммунных реакций может служить нарушение баланса цитокинов за счет активации аутореактивных Т-клеток антигенпредставляющими клетками. Ведущую роль в формировании аутоиммунных реакций играют нарушения дифференцировки Т-клеточного звена. Т-лимфоцитам отводится ключевая роль в развитии аутоиммунных гепатитов (АИГ), так как установлено участие Т-лимфоцитов в иммунных реакциях *in situ*, что находит отражение в образовании в ткани печени лимфоидных скоплений [4].

В 2005 г. выявлена особая субпопуляция Т-клеток – комплекс Т-регуляторных клеток CD4⁺/CD25⁺, которые обладают способностью угнетать активацию и ингибировать секрецию цитокинов CD4⁺/CD25⁺ Т-хелперами и CD8⁺, что в конечном итоге препятствует развитию реакций, направленных на элиминацию чужеродного антигена [7]. Одновременно Т-регуляторные клетки CD4⁺/CD25⁺ сдерживают активацию аутореактивных Т- и В-лимфоцитов [2] и тем самым препятствуют развитию аутоиммунных реакций. Распределение данных клеток в организме человека, помимо кровотока, остается неизученным, как и остается неясной их роль в инициации иммунологических реакций при различных инфекционных заболеваниях. Исследования, посвященные изучению наличия и локализации Т-регуляторных лимфоцитов в паренхиме печени при хронических вирусных гепатитах, в отечественной литературе отсутствуют.

В связи с вышеизложенным представляло интерес определить наличие аутоантител (ASMA, AMA, ANA) в сыворотке крови у больных хроническими вирусными гепатитами и изучить в органе-мишени (печени) морфологическую основу формирования аутоиммунных проявлений, проанализировав популяционный состав лимфоцитов в гепатобиоптате.

Материалы и методы

Обследовано 144 пациента с хроническими вирусными гепатитами – ХВГ (13 с ХВГВ и 131 с ХВГС). Диагноз ХВГ установлен на основании клинико-лабораторных данных. В исследование вошли больные, не имеющие аутоиммунной патологии, хронических заболеваний эндокринной системы, крови.

У всех больных определяли маркеры вирусных гепатитов в сыворотке крови (HBsAg, anti-HBcor IgM, anti-HBcor IgG, anti-HAV IgM, anti-HCV IgM, anti-HCV IgG, anti-HDV IgM, anti-HDV IgG) методом ИФА на базе клинической инфекционной больницы № 2 в иммунологической лаборатории. С целью подтверждения активной

репликации вируса всем больным проведена полуколичественная ПЦР для выявления HBV-ДНК и HCV-РНК в сыворотке крови с определением генотипа вируса гепатита С.

ASMA, AMA, ANA выявляли методом непрямой иммунофлюоресценции (набор реагентов ATS COMVI-I IMMCO Diagnostic, США), anti-LKM-1 определяли методом ИФА (набор реагентов ImmuLisa anti-Liver-Kindeg Microsomal (anti-LKM-1) Antibody ELISA IMMCO Diagnostic, США). Криоглобулины (КГ) выявлены качественным визуализационным методом, ревматоидный фактор (РФ) определялся в сыворотке полуколичественным методом латекс-агглютинации на слайде производства фирмы «HUMAN» (Германия) в соответствии с рекомендациями фирм-производителей.

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 (K. Ishak). Иммунофенотип клеток печени определяли методом иммуногистохимии на криосрезах и иммуноцитохимии на моноклеарных клетках, выделенных из биоптатов в лаборатории клеточного иммунитета ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Мазки из моноклеарных лейкоцитов гепатобиоптатов окрашивались эозином и азуром по Романовскому–Гимзе и по Браше с контрольной обработкой РНКазой, световую микроскопию и фотографирование иммунных клеток печени в окрашенных мазках проводили с помощью фотовидеосистемы Axioplan 2 (фирмы «Carl Zeiss», Германия).

Результаты и обсуждение

Установлено, что у больных ХВГВ в сыворотке крови выявлены ASMA у 36,4%, AMA у 54,5%, ANA у 18,2% больных и anti-LKM-1 – у 9%. РФ в концентрации 200 МЕ/мл определен у 18,2% больных. Полученные нами результаты даже на небольшой выборке больных свидетельствуют, что длительная персистенция HBV приводит к развитию аутоиммунных проявлений.

Во всех группах больных ХВГС установлено наличие ASMA, AMA и anti-LKM-1, причем наибольшее количество больных с ASMA (66,7%) и AMA (48,5%) было в группе с низкой степенью активности, частота anti-LKM-1 во всех группах колебалась от 11,5 до 14,3%, наибольшая частота встречаемости ANA зарегистрирована у больных с циррозом печени (15,4%).

Среди больных ХВГС наиболее высокая частота встречаемости КГ выявлена у больных с низкой (35,7%) и умеренной (44%) степенью гистологической активности, а у больных с минимальной степенью активности КГ диагностированы у 14,3%, с циррозом – у 16,7%. Наиболее высокая частота встречаемости РФ выявлена среди больных ХВГС с умеренной (40%) и минимальной (38,1%) степенью активности, а у больных с низкой степенью актив-

ности РФ диагностирован у 28,5%, с циррозом – у 33,3 %. Достоверной разницы в частоте встречаемости РФ среди больных ХВГС различной степени активности выявлено не было, что свидетельствует об отсутствии прямой зависимости наличия РФ у больных ХВГС от гистологической активности.

В биоптате печени у обследованных больных нами выявлена выраженная лейкоцитарная инфильтрация печени, которая возникала, а затем распространялась внутрь печеночных долек. В лейкоцитарных инфильтратах преобладали клетки лимфоидного ряда, при активизации процесса в этих инфильтратах появлялись в большом количестве активированные лимфоциты и макрофаги. Количество мононуклеарных лейкоцитов, достаточное для иммуноцитологического анализа, удалось выделить только из гепатобиоптатов пациентов с выраженной лимфоидной инфильтрацией, что в основном наблюдалось у больных ХГВ и ХГС с умеренной и высокой гистологической активностью гепатита (рис. 1 см. на 3-й полосе обложки).

При изучении фенотипа мононуклеарных лейкоцитов в области лимфоидных инфильтратов нами обнаружены участки клеток, экспрессирующие маркеры CD4⁺ и CD25⁺. Зеленое мембранное свечение дают Т-хелперы (CD4⁺), красное – клетки, несущие рецепторы к ИЛ-2 (CD25) (рис. 2, 3 см. на 3-й полосе обложки).

При двойном окрашивании в области лимфоидного инфильтрата печени наряду с CD4⁺- (зеленое свечение) и CD25⁺-клетками (красное свечение) нами определены двойные позитивные клетки, экспрессирующие одновременно маркеры CD4⁺ и CD25⁺ (CD4⁺/CD25⁺-клетки – желтое свечение).

Выявленная в паренхиме печени популяция комплекса Т-регуляторных клеток (CD4⁺CD25⁺) вызывает супрессию клеточного иммунного ответа при элиминации вируса из поврежденных тканей и обеспечивает развитие персистирующей вирусной инфекции с аутоиммунным компонентом [9]. В нормальных условиях Т-регуляторные клетки анергичны, но способны к распознаванию и прямой пролиферации в ответ на антигенемии. Из источников литературы известно, что при HBV-инфекции регуляторные Т-лимфоциты являются одним из медиаторов супрессии Th1 в ответ на HBsAg, так как вызывают увеличение ИЛ-10-секретирующих CD4⁺CD25⁺-клеток, в свою очередь HBsAg стимулирует Th2 [9], обеспечивая развитие персистирующей вирусной инфекции с аутоиммунным компонентом. Следовательно, выделенный нами в лейкоцитарном инфильтрате печени комплекс Т-регуляторных клеток (CD4⁺CD25⁺) свидетельствует о развитии аутоиммунных реакций в печеночной ткани.

Согласно данным литературы, у пациентов с ХВГС индуцированные комплекс Т-регуляторных лимфоцитов и CD8⁺-лимфоциты вызывают локальное воспаление в печени [6]. У обследованных нами больных мы выявили в гепатобиоптате лимфоидное воспаление и не выявили признаков некроза. Данную морфологическую картину можно объяснить присутствием в печеночной ткани комплекса

Т-регуляторных клеток (CD4⁺CD25⁺).

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют, что выявленный нами в гепатобиоптате у больных хроническими вирусными гепатитами комплекс Т-регуляторных лимфоцитов (CD4⁺CD25⁺) является морфофункциональной основой для формирования аутоиммунных проявлений на фоне персистирующей вирусной инфекции у больных вирусными гепатитами.

Для всесторонней оценки клинического течения и прогноза у больных хроническим вирусным гепатитом необходимо наряду с определением показателей гистологической активности и фиброза оценивать выраженность, распространенность и субпопуляционный состав лейкоцитарных инфильтратов печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Апросина З.Г.* Аутоиммунный гепатит // Гепатол. форум. – 2009. – № 1. – С. 4–9.
2. *Рабсон А., Роит А., Делвз П.* Основы медицинской иммунологии. – М., 2006.
3. *Царегородцева Т.М., Серова Т.И.* Цитокины в гастроэнтерологии. – М., 2003.
4. *Чепель Э., Хейни М., Мисбах С., Сновден Н.* Основы клинической иммунологии. – М., 2008.
5. *Шерлок Ш., Дули Дж.* Заболевания печени и желчных путей. – М., 2002.
6. *Accapezzato D., Francavilla V., Paroli M., Casciaro M., Chirco L.V.* Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8⁺ T cell population in chronic hepatitis C virus infection // J.Clin. Invest. – 2004. – Vol. 113. – P. 963–972.
7. *Fu J.L., Xu D.P., Shi M.* The phenotype and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in hepatitis B patients // Zhonghua Nei Ke Za Zhi. – 2006. – Vol. 45, N 8. – P. 642–645.
8. *Gramenzi A., Andreone P., Loggi E.* Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection // J. Viral Hepat. – 2005. – Vol. 12, N 5. – P. 525–530.
9. *Kondo Y., Kobayashi K., Ueno Y. et al.* Mechanism of T cell hyporesponsiveness to HBsAg is associated with regulatory T cells in chronic hepatitis B // Wld J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 12, N 27. – P. 4310–4317.
10. *Walker B.D.* Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in person with prolonged infection and low viral load / J. Immunol. – 1996. – Vol. 156, N 5. – P. 2616–2623.
11. *Zignego A.L., Brechot C.* Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies // J. Hepatol. – 1999. – Vol. 31. – P. 369–376.

Поступила 04.09.12

Сведения об авторах:

Волчкова Елена Васильевна, д-р мед. наук, проф., зав. каф. инфекционных болезней медико-профилактического фак. Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, e-mail: antononina@rambler.ru; **Киселевский Михаил Валентинович**, д-р мед. наук, проф., член-кор. РАМН, зав. лаб. клеточного иммунитета РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; **Пархоменко Юрий Георгиевич**, д-р мед. наук, проф., зав. патологоанатомическим отделением ИКБ № 2; **Шуба Леила Ивановна**, канд. мед. наук, доцент каф. инфекционных болезней медико-профилактического фак. Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; **Пак Сергей Григорьевич**, д-р мед. наук, проф., член-кор. РАМН, почетный зав. каф. инфекционных болезней медико-профилактического фак. Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.