

ЛИМФОЦИТНИ СУБПОПУЛАЦИИ ПРИ НОВОДИАГНОСТИЦИРАНИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧЕН ВИРУСЕН ХЕПАТИТ В

А. Михайлова¹, П. Янкова¹, В. Атанасова¹, А. Георгиева¹, Д. Петрова², К. Чернев², М. Балева¹ и Е. Наумова¹

¹Клиника по клинична имунология, ²Клиника по гастроентерология
УМБАЛ „Александровска“, Медицински университет – София

LYMPHOCYTIC SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED CHRONIC HEPATITIS B

A. Mihaylova¹, P. Yankova¹, V. Atanasova¹, A. Georgieva¹, D. Petrova², K. Tzhernev², M. Baleva¹ and E. Naumova¹

¹Clinic of Clinical Immunology, ²Clinic of Gastroenterology
UMHAT "Aleksandrovska", Medical University – Sofia

Резюме:

При 27 болни с новодиагностициран хроничен вирусен хепатит В, нелекувани към момента на изследването (средна възраст 43.96 ± 14.22 г.), и 29 случайно подбрани неродствени здрави индивиди от българската популация са изследвани флоуцитометрично общите Т (CD3+) лимфоцити, хелперно-индусерните (CD3+CD4+) и супресорно-цитотоксични (CD3+CD8+) клетки, В-лимфоцитите (CD19+) и NK (CD3-CD16+56+) клетки, като и клетки с цитотоксична (CD8+CD11b-) и супресорна (CD8+CD11b+) активност; CD8+CD28+ Т-клетки с ефекторни (цитотоксични) и/или паметови характеристики; CD8+CD57+ крайно диференцирана клетъчна субпопулация с вероятна паметова ефекторна функция; CD3+HLA-DR+, CD8+HLA-DR+ и CD8+CD38+ активирани Т-клетки; Т-лимфоцити с NK клетъчни маркери (NKT – CD3+CD16+56+); CD57+CD8- клетки с NK активност. Установен е дефицит на общи CD3+ Т-лимфоцити за сметка на хелперно-индусерните, супресорно-цитотоксичните и цитотоксичните (CD8+CD11b-; CD8+CD28+) им субпопулации в групата на пациентите, като разликите са статистически достоверни ($p < 0.001$). Установиха се също повишени CD57+CD8- NK клетки и процент на В-лимфоцити и намалени стойности на CD8+CD38+ клетки. Анализът на тези при болни с хронична нелекувана инфекция с HBV показва, че подбраните от нас клетъчни маркери (CD), дефиниращи определени клетъчни популации и субпопулации чрез многоцветен флоуцитометричен анализ, са информативни за оценка както на вродения, така и на придобития имунен отговор при хронична HBV инфекция.

Ключови думи:

хронична хепатит В вирусна инфекция, клетъчен имунитет

Адрес за кореспонденция:

Проф. Анастасия Михайлова, Клиника по клинична имунология,
УМБАЛ „Александровска“, ул. „Св. Г. Софийски“ № 1, 1431 София,
e mail: mihaylova_ap@abv.bg

Summary:

We investigated the total T (CD3+) lymphocyte count, helper-inducer (CD3+CD4+) and suppressor/cytotoxic (CD3+CD8+) count, B lymphocytes (CD19+) and NK cells (CD3-CD16+CD51+), cytotoxic (CD8+CD11b-) and suppressor cells (CD8+CD11b+); CD8+CD28+ T cells with effector (cytotoxic) and/or memory activity; CD8+CD57+ highly differentiated cell subpopulation with probable memory effector function; CD3+HLA-DR+, CD8+HLA-DR+ and CD8+CD38+ activated T-cells; T lymphocytes with NK-cell markers (NKT – CD3+CD16+56+); CD57+CD8- cells with NK activity in 27 treatment naïve patients with newly diagnosed chronic hepatitis B (HBV, mean age 43.96 ± 14.22 years) and in 29 random non-related healthy Bulgarian individuals using flow cytometry. In HBV patients, we found significant decrease in the total CD3+ T cell count with decrease in helper-inducer, suppressor-cytotoxic and cytotoxic subpopulations (CD8+CD11b-; CD8+CD28+) compared to healthy individuals ($p < 0.001$). We found increased CD57+CD8- NK cells and increased percentage of

<p>Key words:</p> <p>Address for correspondence:</p>	<p>B cells, decreased CD8+CD38+ cells. The results of the investigated patients with chronic and untreated HBV infection suggest that the studied cell markers (CD), defining the different cell populations and subpopulations, using flow cytometry, are informative concerning the inborn and the acquired immune response in chronic hepatitis B infection.</p> <p>chronic hepatitis B infection, cellular immunity</p> <p><i>Prof. Anastasia Mihaylova, M. D., D. Sc., Clinic of Clinical Immunology, University Hospital Aleksandrovska, 1, Sv. G. Sofiyski St., Bg – 1431 Sofia, e-mail: mihaylova_ap@abv.bg</i></p>
--	---

Патогенезата на хроничната инфекция с HBV остава неразгадана. Самият HBV не е директно цитопатогенен. Иmunният отговор на гостоприемника срещу вирусните антигени може да доведе както до изчистване на вируса, така и до разрушаване на инфектираните хепатоцити по време на HBV инфекцията и до чернодробно увреждане. Сега се приема, че генетичните фактори са определящи за хронифицирането на инфекцията с HBV, но те могат да играят роля и при лечението ѝ и отговора на ваксинирането. Рестриктивните от HLA клас I и клас II антигените Т-клетъчни отговори към вируса са силни, поликлонални и мултиспецифични при пациентите с остра инфекция, което води до успешно елиминиране на вируса и до оздравяване. Тези отговори обаче са относително слаби и с по-ограничена специфичност при болните с хронична инфекция, което е основна причина за персистиране на вируса по време на HBV инфекцията.

Основна цел на настоящото проучване е да се сравнят данните от изследването на някои лимфоцитни субпопулации при новооткрити нелекувани болни с хронична HBV инфекция с тези при здрави лица, при които такава инфекция не е доказана.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В проучването са включени 27 болни с новодиагностициран хроничен вирусен хепатит В, нелекувани към момента на изследването (средна възраст 43.96 ± 14.22 г.) и 29 случайно подбрани неродствени здрави индивиди от българската популация, съпоставими по пол и възраст с изследваните болни, без фамилна анамнеза за наследствени заболявания, с нормална чернодробна функция и отрицателни серологични маркери за хепатитни вирусни инфекции. Подборът на пациентите за включване в проучването бе извършен в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ "Александровска" чрез комплексна оценка на съвкупност от включващи и изключващи критерии. Диагнозата на хронична-

та хепатит В инфекция е основана на препоръките на Американската асоциация за проучване на чернодробни болести. Всички включени в проучването пациенти и здрави индивиди са подписали информирано съгласие.

Клетъчният имунитет бе определян чрез имунофенотипизиране на периферна венозна кръв. Методът се базира на маркирането на клетъчните популации с моноклонални антитела, конюгирани с различни флуорохроми. Отчитането на пробите и анализът бяха извършени с флоуцитометър (FACSCanto) и софтуер FACSDiva (Becton Dickinson). За целите на изследването бе съставен набор от моноклонални антитела срещу различни антигени на диференциацията (CD) за многоцветен анализ.

Определяни бяха общи Т (CD3+)-лимфоцити и двете им субпопулации – хелперно-индусерни (CD3+CD4+) и супресорно-цитотоксични (CD3+CD8+), В (CD19+) и NK (CD3-CD16+56+) клетки, както и клетки с цитотоксична (CD8+CD11b-) и супресорна (CD8+CD11b+) активност; CD8+CD28+ Т-клетки с ефекторни (цитотоксични) и/или паметови характеристики; CD8+CD57+ крайно диференцирана клетъчна субпопулация с вероятна паметова ефекторна функция; CD3+HLA-DR+, CD8+HLA-DR+ и CD8+CD38+ активирани Т-клетки; Т-лимфоцити с NK клетъчни маркери (NKT – CD3+CD16+56+); CD57+CD8- клетки с NK активност.

Статистическата обработка на данните за клетъчните популации беше извършена чрез Mann-Whitney U-тест с използване на статистическа програма SPSS v.16. Статистическа значимост бе приета при $p < 0.05$. Резултатите са представени като средна стойност $\pm \sigma$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Сравнението на клетъчните имунни параметри между новодиагностицирани болни с хроничен хепатит В и здрави контроли е представено на табл.1.

Таблица 1. Клетъчни популации при новодиагностицирани пациенти с хроничен хепатит В и здрави контроли

Клетъчна популация %/абс. брой*	Пациенти (n = 26)	Здрави (n = 29)	P
Общи Т-клетки (CD3+)	66.12 ± 8.03 1120 ± 609	74.51 ± 6.31 1512 ± 439	0.000 0.000
Активирани Т-клетки (CD3+HLA-DR+)	6.35 ± 4.53 102 ± 80	9.00 ± 4.74 166 ± 65	0.041 0.006
Хелперно/индусерни Т-клетки (CD3+CD4+)	38.84 ± 7.18 648 ± 326	46.08 ± 6.64 965 ± 313	0.001 0.000
Супресорно/цитотоксични Т-клетки (CD3+CD8+)	23.88 ± 6.35 412 ± 275	29.76 ± 5.97 624 ± 167	0.001 0.000
CD4/CD8 индекс	1.91 ± 1.19	1.65 ± 0.48	0.306
В клетки (CD19+)	12.62 ± 4.49 218 ± 135	9.24 ± 2.81 192 ± 82	0.001 0.698
NK клетки (CD3-CD16+56+)	17.31 ± 6.14 289 ± 160	14.00 ± 6.41 289 ± 149	0.062 0.915
NKT клетки (CD3+CD16+56+)	8.62 ± 4.58 137 ± 8	6.56 ± 4.68 137 ± 113	0.053 0.575
CD57+CD8- клетки	12.08 ± 6.86 199 ± 125	5.30 ± 3.77 115 ± 99	0.000 0.009
CD57+CD8+ клетки	14.81 ± 5.94 268 ± 233	12.74 ± 6.20 267 ± 151	0.278 0.568
CD8+CD11+ клетки	13.58 ± 5.09 232 ± 143	10.71 ± 4.09 220 ± 104	0.049 0.950
CD8+CD11b- клетки	13.92 ± 3.80 234 ± 120	19.30 ± 6.10 388 ± 138	0.005 0.001
CD8+CD28+ клетки	12.38 ± 3.60 204 ± 98	17.34 ± 3.80 340 ± 115	0.001 0.000
CD8+CD38+ клетки	15.27 ± 6.25 239 ± 126	21.70 ± 7.04 425 ± 123	0.007 0.000
CD8+HLA-DR+ клетки	5.19 ± 2.81 87 ± 66	6.78 ± 4.14 132 ± 70	0.210 0.025

* – клетки/mcl

Нашите резултати показаха дефицит на общи CD3+ Т-лимфоцити за сметка на хелперно-индусерните (CD3+CD4+), супресорно-цитотоксичните (CD3+CD8+) и цитотоксичните (CD8+CD11b-; CD8+CD28+) им субпопулации в групата на пациентите, като разликите са статистически достоверни ($p < 0.001$) в сравнение със здравите. Клетките, експресиращи активационни маркери (CD3+HLA-DR+, CD8+HLA-DR+), са намалени по абсолютен брой при пациентите в сравнение със здравите. Установиха се също повишени CD57+CD8- NK клетки и процент на В-лимфоцити, и намалени стойности на CD8+CD38+ клетки. Общите NK (CD3-CD16&56+) и NKT (CD3+CD16&56+) клетки в групата на болните са в високи относителни стойности, но без статистическа значимост.

Обобщавайки и анализирайки нашите предварителни резултати можем да заключим, че при пациенти с хроничен хепатит В се наблюда-

ват нарушения в имунния отговор, засягащи както клетъчни популации, участващи в придобития (адаптивния), така и такива, отговорни за вродения имунен отговор. Наблюдаваният дефицит на общи Т-лимфоцити и хелперно-индусерната им (CD3+CD4+) субпопулация е в съответствие с резултатите на повечето изследователи [1, 2, 3], но се различава от тези на Ма и сътр. [4], които намират повишени стойности на посочените популации при пациенти с хроничен хепатит В преди терапия. Данните за промените в супресорно-цитотоксичните (CD3+CD8+) Т-клетки при HBV инфекция са противоречиви. За разлика от горните [1, 2, 3], но подобно на други автори [4, 5, 6], ние установихме при нелекувани (новодиагностицирани) болни с хронична HBV инфекция дефицит и на супресорно-цитотоксични (CD3+CD8+) Т-клетки за сметка на ефекторните (цитотоксични) субпопулации. Тази наша находка е в подкрепа на нарушение в

ефекторното звено на адаптивния имунен отговор, отговорно за ефективно елиминиране на вируса. Липсата на значими промени в стойностите на общите NK клетки (CD3-CD16+56+) вероятно се дължи на факта, че тази клетъчна популация участва в ранния, неспецифичен имунен отговор срещу вируса. В достъпната ни литература има ограничени и дори липсващи данни за допълнителните функционални клетъчни субпопулации, изследвани от нас – CD8+CD38+, CD8+CD28+, CD57+CD8+, CD57+CD8-, CD8+CD11b+, CD8+CD11b-, CD8+HLA-DR+, CD3+CD16+56+ при хронична инфекция с HBV. За разлика от нас Сао и сътр. [4] установяват повишена пропорция, но не и абсолютен брой на активирани CD8+CD38+ Т-клетки при пациенти с хроничен хепатит В в сравнение с носители на HBV и здрави контроли, като процентът им намалява и се нормализира в резултат на проведената терапия с нуклеозидни аналози. Подобни на нашите са данните на тези автори за абсолютен дефицит на CD8+CD28+ клетки с ефекторна и/или паметова функция. Установените от нас различия спрямо тези на други изследователи могат да се обяснят с факта, че хроничната инфекция с HBV е динамично заболяване и в зависимост от прогресията на болестта могат да се наблюдават различни имунни нарушения.

Анализът на нашите резултати от изследване на клетъчния имунен отговор при хронична инфекция с HBV показва, че подобренията от нас

клетъчни маркери (CD), дефиниращи определени клетъчни популации и субпопулации чрез многоцветен флоуцитометричен анализ, са информативни за оценка както на вродения, така и на придобития имунен отговор при тези болни.

Изследването е спонсорирано от грант ДТК02/12 от 16.12.2009 г. на Национален фонд „Научни изследвания“ – България

Библиография

1. You, J. et al. Peripheral T-lymphocyte subpopulations in different clinical stages of chronic HBV infection correlate with HBV load. – *World J. Gastroenterol.*, **15**, 2009, 3382-3393.
2. You, J. et al. Hepatitis B virus DNA is more powerful than HBeAg in predicting peripheral T-lymphocyte subpopulations in chronic HBV-infected individuals with normal liver function tests. – *World J. Gastroenterol.*, **14**, 2008, 3710-3718.
3. Tian, Y., Z. F. Qiu et T. S. Li. Difference and significance of peripheral blood T-lymphocyte subsets in patients with chronic hepatitis B and asymptomatic HBV carriers. – *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **85**, 2005, 3354-3358.
4. Ma, L. et al. Treatment with telbivudine positively regulates antiviral immune profiles in chinese patients with chronic hepatitis B. – *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 2013, 1304-1311.
5. Cao, W., Z. F. Qiu et T. S. Li. Parallel decline of CD8+CD38+ lymphocytes and viremia in treated hepatitis B patients. – *World J. Gastroenterol.*, **17**, 2011, 2191-2198.
6. Boni, C. et al. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. – *Hepatology*, **33**, 2001, 963-971.

Постъпила за печат на 26 август 2013 г.