

**В.В. Новицкий, И.О. Наследникова, Н.В. Рязанцева, Н.В. Токарева,  
Э.И. Белобородова, Л.Е. Дунаева, Е.В. Белобородова, М.А. Антошина,  
В.В. Белоконь, О.Б. Жукова**

## **ЛИМФОЦИТЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С: ПОВЕРХНОСТНАЯ АРХИТЕКТОНИКА, МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАНЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ**

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Исследование пролиферативного потенциала, поверхностной архитектуры и структуры плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С умеренной и минимальной степеней активности выявило изменение Т-клеточного лимфопролиферативного ответа и процентного содержания лимфоцитарных клеток с различным типом поверхностного микрорельефа, а также повышение микровязкости липидной фазы плазматической мембраны лимфоцитов.

**Ключевые слова:** вирус гепатита С, лимфоциты, реакция бласттрансформации лимфоцитов, сканирующая электронная микроскопия, мембрана

Несмотря на постоянно расширяющийся объем знаний о причинах развития хронических вирусных инфекций, многие вопросы, касающиеся механизмов возникновения и прогрессирования этой патологии, остаются открытыми. Недостаточно изучены факторы, позволяющие вирусу гепатита С длительно сохраняться в макроорганизме, и условия, влияющие на развитие хронических форм болезни. Неразрешенным остается вопрос о причинах, приводящих к разным исходам болезни: в одних случаях развивается циклическое течение с элиминацией инфектогена, в других — длительно сохраняется высокая репликативная активность вируса с формированием хронического воспалительного процесса [5, 10, 11, 18].

Такие особенности хронической вирусной инфекции обусловлены состоянием иммунной системы организма, от адекватности которой зависят течение и исход заболевания. При этом особый интерес к изучению особенностей структурно-функционального статуса лимфоцитарных клеток обусловлен не только тем фактом, что иммунная система, как очевидно, принимает непосредственное участие в реализации инфекционного процесса, но и тем, что иммунокомпетентные клетки сами являются мишенью для действия вируса гепатита С [5, 12].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение структурных и функциональных особенностей лимфоцитов периферической крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С.

### **Методика**

Обследовали 37 пациентов (22 мужчины и 15 женщин в возрасте от 18 до 45 лет) с хроническим течением вирусного гепатита С умеренной (20 больных) и минимальной (17 больных) степеней активности. У 21 пациента был выявлен 1b-генотип, у 12 обследованных — 3a-генотип и у 4 больных — 2a-генотип вируса гепатита С. Критерием исключения из исследования являлась алкогольная и наркотическая зависимость пациентов. Все пациенты были обследованы до начала проведения лечения. Исследования проводили в соответствии с этическими нормами. Верификация диагноза была проведена на основании данных клинико-эпидемиологического, инструментального (сцинтиграфического, ультразвукового и морфологического исследование печени), серологического (иммуноферментный анализ) и молекулярно-генетического (полимеразная цепная реакция) методов исследования. Контрольную группу составили 20 практически здоровых доноров со схожими характеристиками по полу и возрасту. Исследовали стабилизированную гепарином (25 ЕД/мл) венозную кровь, взятую утром до приема пищи.

Культуральную суспензию для теста бласттрансформации лимфоцитов готовили по методике Е.Д. Гольдберга и соавт. [4]. В суспензию вносили фитогемагглютинин («Difco», Германия) в концентрации 0,01 мг/мл культуры. Результаты теста выражали количеством неизмененных, переходных и бластных форм лимфоцитов (%) [7].

Поверхностную архитектуру лимфоцитов периферической крови оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Лимфоциты периферической крови выделяли на градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция). Производили их подсчет общепринятыми гематологическими методами ( $2 \times 10^5$  клеток/мл) [9]. Лимфоциты фиксировали в 2,5% растворе глutarового альдегида, постфиксацию материала проводили в 1% растворе четырехоксида осмия и обезживали в серии водных растворов этилового спирта возрастающей концентрации. Дегидратированные лимфоциты наносили тонким слоем на алюминиевые подложки, препараты напыляли серебром в вакуумной установке «JEE-4B» («JEOL», Япония). Исследование препаратов проводили с использованием электронного микроскопа «JEM-100 CX II» с растровой приставкой «ASID-4D» («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ [6]. В соответствии с классификацией, предложенной Г.И. Козинцом [6], в зависимости от особенностей поверхностного микрорельефа лимфоцитов выделяли относительно гладкие клетки, лимфоциты с микроворсинками, клетки с ламеллярными образованиями (со складками и рафлами), лимфоциты со сфероидными образованиями (с пузырьками), а также клетки с углублениями и выростами на поверхности.

Для оценки микровязкостных свойств плазматической мембраны лимфоцитов проводили флуоресцентное зондирование клеток флуорофором пирен («Sigma», США). Взаимодействие мембраны с флуоресцентным зондом пирен регистрировали на спектрофлуориметре «MPF-4» («Hitachi», Япония). Микровязкость липидной фазы мембраны лимфоцитов оценивали по степени эксимеризации пирена, мигрирующего в ее гидрофобном компартменте (использовали среду 145мМ NaCl, 10мМ трис-HCl, pH=7,4) при длине возбуждающего света ( $\lambda_{\text{в}}$ ) 285 нм. Раствор пирена (растворитель — этанол) добавляли в кювету со взвесью лимфоцитарных клеток до конечной концентрации 10 мкМ, инкубировали в течение 10 мин. Определяли коэффициенты эксимеризации пирена, равные отношению максимумов ин-

тенсивностей флуоресценции эксимерной формы зонда при длине волны 470 нм ( $I_{470}$ ) к мономерным его формам при длинах волн 370 и 390 нм ( $I_{370}$ ,  $I_{390}$ ) соответственно. Рассчитывали показатель миграции энергии с триптофановых остатков белка на пирен [2].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили путем вычисления г-коэффициента Спирмена.

### Результаты

Наше исследование было акцентировано на изучении структурно-функционального статуса лимфоцитов периферической крови в условиях развития хронического вирусного гепатита С. Как известно, в ответ на попадание вируса в макроорганизм срабатывают врожденные и адаптивные механизмы иммунного ответа, направленные на ограничение и элиминацию инфекции. Показано, что основная роль в формировании противовирусного иммунитета принадлежит клеточным механизмам, состояние которых определяет как исход первичного инфицирования, так и развитие хронических форм болезни [10, 14, 16]. В то же время имеются убедительные данные в пользу способности вируса гепатита С инфицировать лимфоцитарные клетки и, вероятно, оказывать непосредственное влияние на их структуру и функцию [5, 12, 15]. Важным условием эффективности иммунопатологических механизмов защиты макроорганизма при вирусных инфекциях является интенсивность иммунного ответа, определяемая функциональной активностью Т-лимфоцитов. Проведенное нами исследование реакции бласттрансформации лимфоцитов периферической крови под влиянием специфического стимулятора Т-клеточного звена иммунитета фитогемагглютинаина у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С умеренной и минимальной степеней активности позволило зарегистрировать изменение функциональной активности Т-системы иммунитета (Таблица 1). Предыдущими исследованиями показано, что пролиферативный ответ Т-лимфоцитов, оцененный в реакции бластной

Таблица 1

### **Пролиферативная активность лимфоцитов периферической крови (%) у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С ( $\bar{X} \pm m$ )**

Формы лимфоцитов	Здоровые доноры	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом С	
		Умеренной степени активности	Минимальной степени активности
Бласттрансформированные	74,26±1,78	89,12±2,33***	92,64±2,56**
Переходные	18,99±0,95	8,55±0,78**	6,02±0,56*
Неизмененные	6,75±0,38	2,33±0,12***	1,34±0,09**

Примечание. \* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,05$  по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

трансформации, изменялся при развитии многих вирусных инфекций (Эпштейн-Барр-вирусная, цитомегаловирусная, герпесвирусная) [13]. Вероятно, обнаруженное нами изменение Т-клеточного лимфопролиферативного потенциала правильно расценивать с позиции существования типовой универсальной реакции иммунокомпетентных клеток на длительную персистенцию вирусов.

Функциональная активность лимфоцитов, как очевидно, определяется особенностями их ультраструктуры [6]. Оценка поверхностной архитектуры лимфоцитов периферической крови позволила выявить отчетливые изменения микрорельефа клеток. Так, у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С умеренной и минимальной степеней активности было отмечено достоверное снижение количества относительно гладких и ворсинчатых лимфоцитов на фоне увеличения количества клеток со сфероидными и ламеллярными образованиями на поверхности

по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров (Таблица 2, Рис.). Однако при обследовании больных с хроническим вирусным гепатитом С минимальной степени активности было выявлено статистически значимое снижение (относительно контроля) процентного содержания лимфоцитов с углублениями и выростами на поверхности (Таблица 2). Следует также подчеркнуть, что у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С минимальной степени активности количество лимфоцитарных клеток со сфероидными образованиями на поверхности было практически в 3 раза выше, чем у больных с хроническим вирусным гепатитом С умеренной степени активности (Таблица 2, Рис.).

На наш взгляд, изменения поверхностной архитектуры лимфоцитарных клеток у обследованных пациентов могли быть обусловлены, с одной стороны, непосредственным воздействием вируса гепатита С на плазматическую мембрану клеток [5, 12, 18], с другой, что наиболее вероятно, — изменением функциональной активности лимфоцитов [18]. В пользу последнего предположения свидетельствовали повышение количества лимфоцитов с разнообразными образованиями на поверхности (пузыри, складки) [6], а также результаты проведенного корреляционного анализа. Было показано, что усиление Т-клеточного пролиферативного ответа сопряжено с возрастанием количества лимфоцитов со сфероидными образованиями на поверхности клетки (при хроническом гепатите С умеренной степени активности —  $r=0,91$ ,  $p<0,01$ ; минимальной степени активности —  $r=0,87$ ,  $p<0,05$ ). Исходя из полученных результатов логично предположить, что структурная дезорганизация поверхностного рельефа лимфоцитов представляет собой один из вариантов ответной реакции клеток на антигенное воздействие [6].

Основу структурной организации плазматической мембраны лимфоцита составляет липидный бислой с асимметрично встроенными белками. Липидные молекулы, являясь важными структурными и функциональными компонентами мембраны клетки, поддерживают конформационное состояние мембранных ферментов, регулируют подвижность и активность внутримембранных белков, обеспечивают в клетке селективную проницаемость и работу рецепторного аппарата. Нормальное функционирование плазматической мембраны зависит от ее микровязкостных свойств, определяемых, главным образом, состоянием липидной фазы [3, 8, 17]. В предпринятом нами исследовании было выявлено отчетливое изменение текучести липидного бислоя мембраны лимфоцитов у пациентов с

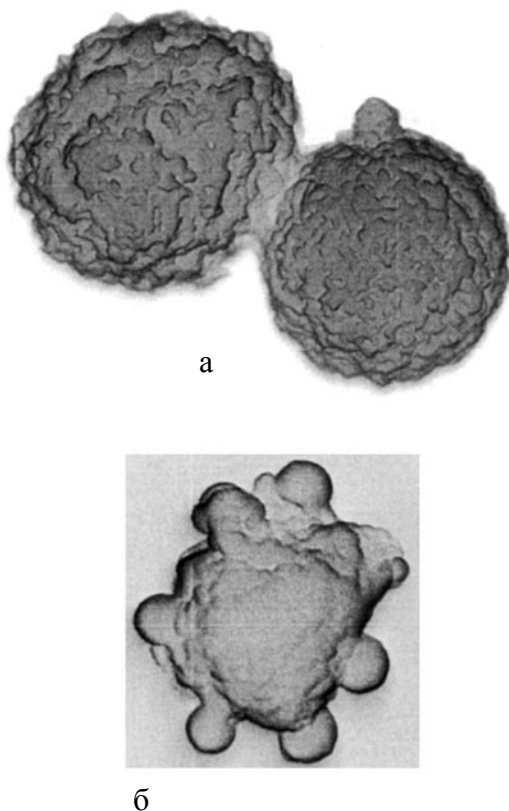


Рис. Поверхностная архитектура лимфоцитов периферической крови при хроническом вирусном гепатите С минимальной (а) и умеренной (б) степени активности. Сканирующая электронная микроскопия.  
а — лимфоциты со складчатой поверхностью,  $\times 10000$ .  
б — лимфоцит со сфероидными образованиями на поверхности,  $\times 10000$ .

хроническим вирусным гепатитом С умеренной и минимальной степеней активности (Таблица 3). Об этом свидетельствовало достоверное снижение коэффициентов эксимеризации ( $I_{470}/I_{370}$  и  $I_{470}/I_{390}$ ) неполярного зонда пирен, диффундирующего в гидрофобном компартменте клеточной мембраны, при длине волн возбуждающего света 285 нм. Поскольку величина эксимеризации пирена обратно пропорциональна вязкости липидной фазы мембраны, зарегистрированное снижение средних величин этих показателей у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С указывает на повышение упорядоченности липидных молекул в лимфоцитарной мембране в области белок-липидных контактов. Также в пользу нарушений белок-липидных взаимодействий свидетельствовало достоверное снижение средних значений величины индуктивно-резонансного переноса энергии с триптофановых остатков мембранных белков на пирен (Таблица 3).

Известно, что изменение поверхностной архитектуры клеток крови является результа-

том дезорганизации структуры плазматической мембраны [1]. Проведенный корреляционный анализ позволил подтвердить данное положение. Так, у обследованных пациентов с хроническим вирусным гепатитом С снижение коэффициента эксимеризации пирена  $I_{470}/I_{390}$  при 285 нм было связано со снижением количества относительно гладких (при хроническом гепатите С умеренной степени активности —  $r=0,95$ ,  $p<0,01$ ; минимальной степени активности —  $r=0,67$ ,  $p<0,05$ ) форм лимфоцитов.

### Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при хроническом вирусном гепатите С имеют место отчетливые структурно-функциональные изменения лимфоцитов периферической крови. Выявленные нами изменения поверхностной архитектуры, микровязкости мембраны и функциональной активности лимфоцитов при хроническом вирусном гепатите С, вероятно, способствуют поддержанию длительной вирусной персистенции.

Таблица 2

**Содержание лимфоцитов периферической крови с различным типом поверхностного микрорельефа (%) у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С ( $\bar{X} \pm m$ )**

Типы лимфоцитов	Здоровые доноры	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом С	
		Умеренной степени активности	Минимальной степени активности
Относительно гладкие	57,52±3,24	37,20±2,15**	32,35±3,24**
Ламеллярные	21,69±1,62	46,33±3,12**	44,51±2,08**
Ворсинчатые	7,95±0,83	1,44±0,32**	3,62±1,41***
С углублениями	1,49±0,24	1,34±0,08	4,91±1,38**
С выростами	9,16±1,13	8,43±1,10	4,60±1,02** # # #
С пузырями	2,19±0,35	5,26±1,07***	10,01±1,42** # #

Примечание. # # #  $p<0,05$ , # #  $p<0,01$  по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С умеренной степени активности. \* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,05$  по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

Таблица 3

**Характеристика взаимодействия флуоресцентного зонда пирен с плазматической мембраной лимфоцитов периферической крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С ( $\bar{X} \pm m$ )**

Параметры флуоресценции	Здоровые доноры	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом С	
		Умеренной степени активности	Минимальной степени активности
$I_{470}/I_{370}$ , лВ=285 нм, усл. ед.	1,373±0,019	1,195±0,013 **	1,099±0,024 *
$I_{470}/I_{390}$ при лВ=285 нм, усл. ед.	1,400±0,012	1,207±0,016 **	1,232±0,016 **
Величина миграции энергии с триптофана на пирен, %	59,48±3,05	47,30±2,58 **	49,23±2,17 ***

Примечание: \* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,05$  по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-1051.2003.4.

**Lymphocytes at chronic hepatitis C:  
surface architectonic, microviscosity  
of membrane and functional activity**

V.V. Novitsky, I.O. Naslednikova,  
N.V. Ryazantseva, N.V. Tokareva,  
E.I. Beloborodova, L.E. Dunaeva,  
E.V. Beloborodova, M.A. Antoshina, V.V. Belokon',  
O.B. Zhukova

The study of proliferative potential, surface architectonics and structure of plasma membranes of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis C of moderate and minimal activity revealed some changes in T-cell proliferative response, changes in the percentage of lymphocytes with different types of surface microrelief as well as increase of microviscosity of the lipid phase of lymphocyte's plasma membrane.

**Литература**

1. Атлас. Клинический патоморфоз эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая и др. — Томск; М., 2003.
2. Владимиров Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров. — М., 1983.
3. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функция / Р. Геннис. — М., 1997.

4. Гольдберг Е.Д. Методы культуры тканей в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. — Томск, 1992.
5. Ивашкин В.Т., Маммаев С.Н., Буеверов А.О. и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, копрологии. 2000. №5. С. 7-12.
6. Клетки крови — современные технологии их анализа / Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Д.А. Шмаров и др. — М., 2002.
7. Козинец Г.И. // Проблемы гематологии и переливания крови. — 1978. — № 7. — С. 41-46.
8. Конев С.В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. — Минск, 1987.
9. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова. — М., 1987.
10. Маммаев С.Н., Лукина Е.А., Шульпекова О.Ю. и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, копрологии. — 2002. — № 2. — С. 55-60.
11. Непомнящих Г.И., Толоконская Н.П., Айдагулова С.В. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2003. — Т. 135. — № 3. — С. 343-348.
12. Серов В.В., Апросина З.Г., Игнатова Т.М. и др. // Вестник РАМН. — 2003. — № 4. — С. 34-37.
13. Уразова О.И., Новицкий В.В., Помогаева А.П. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2002. — № 12. — С. 34-36.
14. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. // Иммунология. — 2000. — № 1. — С. 61-64.
15. Guarini P., Stanzial A.M., Olivieri O. et al. // Clin. Chim. Acta. — 1998. — Vol. 270. — P. 139-150.
16. Kozeil M.J. // J. of Viral Hepatitis. — 1997. — Vol. 4. — № 2. — P. 31-41.
17. Mavoungou E., Georges-Courbot M.C., Poatu-Mavoungou et al. // J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. — 1997. — Vol. 16. — № 1. — P. 1-9.
18. Zignego A.L., De Carli M., Monti M. et al. // J. Med. Virol. — 1995. — Vol. 26. — P. 190-195.