

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ ПРИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЕ БОЛЬШИХ РАЗМЕРОВ

А. А. Стасенко, О. Г. Котенко, А. В. Гриненко, А. А. Коршак, А. Н. Остапишен  
Национальный институт хирургии и трансплантологии имени А. А. Шалимова НАМН Украины, г. Киев

## IMMUNOLOGICAL FACTORS OF THE INBORN IMMUNITY IN PATIENTS, SUFFERING HEPATOCELLULAR CARCINOMA OF LARGE SIZE

A. A. Stasenko, O. G. Kotenko, A. V. Grinenko, A. A. Korshak, A. N. Ostapishen

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) — одна из наиболее часто выявляемых злокачественных опухолей [1, 2]. Частота ее обнаружения в странах Европы в последние десятилетия значительно увеличилась и составляет 10 — 20 на 100 000 жителей в год. Наряду с хроническим вирусным гепатитом В, С и D, наследственными заболеваниями печени, химическими канцерогенами наиболее частой причиной возникновения ГЦК является хроническая алкогольная гепатопатия. Частота выявления ГЦК у мужчин в 4 — 10 раз больше, чем у женщин. Для клинической практики важно, что у каждого пациента при хроническом поражении печени или циррозе повышается риск возникновения ГЦК. Степень риска коррелирует с тремя факторами: этиологией, длительностью и активностью заболевания печени. Особенно высока вероятность возникновения ГЦК у больных при циррозе печени (ЦП), сформировавшемся на фоне хронического гепатита С (почти у 60% больных в течение жизни), хронического гепатита В (примерно у 50%), гемохроматоза (у 40%), а также обусловленного алкоголем (у 30%) [3].

При проникновении вируса гепатита В (HBV) в организм человека возникает острый или хронический гепатит, ЦП и ГЦК. Более 350 млн. пациентов, инфицированных HBV, представляют источник его распространения путем горизонтальной и вертикальной передачи. HBV обладает способностью к реп-

### Реферат

Изучены факторы врожденного иммунитета у пациентов при гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК) больших размеров. До лечения у больных выявлены повышенная метаболическая активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в спонтанном НСТ—тесте, уменьшение резерва НГ в НСТ—тесте, слабая активация поглотительной функции НГ в реакции фагоцитоза. После выполнения хирургического вмешательства на 7 — 8—е сутки наблюдали уменьшение количества формазан—положительных НГ в спонтанном НСТ—тесте, повышение резерва метаболической активности НГ по сравнению с исходными величинами.

**Ключевые слова:** гепатоцеллюлярная карцинома; нейтрофильные гранулоциты; метаболическая активность; фагоцитарный индекс; фагоцитарное число.

### Abstract

Factors of the inborn immunity in patients, suffering hepatocellular carcinoma of large size, were studied. Preoperatively the raising of metabolic activity of neutrophils in spontaneous NST—test, the neutrophils reserve reduction in NST—test, weak activation of the neutrophils absorption function in a phagocytosis reaction were noted. On the 7 — 8th postoperative day a reduction of quantity of formazan—positive neutrophils in spontaneous NST—test, raising of reserve of the neutrophils metabolic activity, comparing with initial values, were observed.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; neutrophils; metabolic activity; phagocytic index; phagocytic number.

ликация в гепатоцитах и не оказывает прямого цитопатического действия [4]. Повреждение печени при HBV инфекции иммуноопосредованно [5]. Основную роль в формировании иммунного ответа при HBV инфекции играют реакции адаптивного (приобретенного) иммунитета, которые лежат в основе патогенеза повреждения печени и клиренса HBV. Врожденный иммунитет не играет существенной роли в этом процессе [6].

Важное значение в повреждении печени и разрешении HBV инфекции имеют специфические цитотоксические лимфоциты (CTL). Персистенция HBV отражает неспособность CTL к обеспечению адекватного иммунного ответа и обус-

ловливает возникновение хронического воспалительно—некротического процесса в печени с последующим формированием ЦП и/или ГЦК [7]. ГЦК, как правило, диагностируют у пациентов при хроническом гепатите В на фоне вялотекущего воспаления в печени и минимальной деструкции гепатоцитов. Такое воспаление поддерживают функционально неполноценные вирусспецифические CTL, не способные обеспечить клиренс HBV в клетках печени. Таким образом, хроническое повреждение гепатоцитов вирусом гепатита В рассматривают в качестве потенциально предопухолового процесса вследствие нарушения баланса между регенерацией гепатоцитов (синтез клеточной ДНК)

и воспалением (продукция мутагенов) [4, 8]. При длительном процессе регенерации и воспаления в печени возникают спонтанные множественные генетические/хромосомные нарушения, ответственные за формирование ГЦК [5].

Размножение HCV обычно происходит быстрее, чем формирование вируснейтрализующих иммунных реакций, вследствие динамичной кинетики репликации. При последующем распространении вируса включаются дополнительные механизмы повреждения функций Т- и В-лимфоцитов, что увеличивает возможность его хронической персистенции [5].

При возникновении ГЦК в противоопухолевой защите повышается роль врожденного иммунитета (НК-клеток, НГ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для анализа иммунологических факторов врожденного иммунитета изучены особенности метаболической и фагоцитарной активности НГ крови у 8 пациентов, оперированных по поводу ГЦК, до и через 7–8 сут после операции.

Возраст больных от 48 до 76 лет, в среднем 65,4 года, женщин — 2, мужчин — 6.

Контрольную группу составил 21 здоровый донор.

Тест с нитросиним тетразолием (НСТ—тест) и реакцию фагоцитоза проводили общепринятыми методами [9, 10]. Метаболическую актив-

ность НГ исследовали в спонтанном (Сп) и стимулированном (Ст) НСТ—тестах. Определяли показатель резерва (ПР) НГ. Фагоцитарную активность НГ оценивали в реакции фагоцитоза. Определяли фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) НГ.

В качестве объекта фагоцитоза и стимулятора метаболической активности НГ использовали частички дрожжей *Candida*.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием стандартной программы с вычислением достоверности различий по t—критерию Стьюдента и корреляции показателей с помощью регрессионного анализа с использованием программы Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При патологических состояниях важную роль играют клетки врожденного иммунитета — НГ, макрофаги, а также провоспалительные цитокины [11].

На основании результатов исследований, проведенных в последние десятилетия, установлена роль НГ в иммунитете в качестве носителей важных регуляторных свойств, модуляции клеточного и гуморального иммунитета, поскольку эти клетки выполняют функции межсистемного регулятора, участвующего в обеспечении взаимодействия иммунной, нервной и эндокринной систем [12].

Результаты исследования метаболической и фагоцитарной активности НГ у больных, оперированных по поводу ГЦК, представлены в *табл. 1*.

Отмечено повышение метаболической активности НГ в Сп НСТ—тесте и снижение ПР НГ в НСТ—тесте до операции у больных при ГЦК, что свидетельствовало об истощении кислородзависимого потенциала в ответ на хроническую вирусную инфекцию.

Результаты наших исследований согласуются с данными других авторов об уменьшении показателей Ст НСТ—теста по сравнению с таковыми Сп НСТ—теста при хронической HCV инфекции [13].

До операции у больных установлено снижение активации поглотительной функции НГ в реакции фагоцитоза (уменьшение ФИ и ФЧ).

На 7–8—е сутки после хирургического вмешательства наблюдали нормализацию факторов врожденного иммунитета, что проявлялось уменьшением количества формазан—положительных НГ в Сп НСТ—тесте и повышением ПР метаболической активности НГ. Метаболическая активность НГ в Сп НСТ—тесте после операции не достигала таковой у здоровых лиц, ПР — нормализовался.

Оперативное вмешательство также оказывало благоприятное влияние на поглотительную функцию НГ у больных.

Отмечена нормализация ФИ и ФЧ в реакции фагоцитоза у больных

Таблица 1. Метаболическая и фагоцитарная активность НГ у больных

| Группы обследованных         | Величина показателя ( $\bar{x} \pm m$ ) |            |                         |                         |                          |
|------------------------------|---|------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                              | Сп НСТ, %                               | Ст НСТ, %  | ПР, %                   | ФИ, %                   | ФЧ, усл. ед.             |
| Доноры (n=21)                | 13,6 ± 2,3                              | 63,7 ± 3,0 | 42,5 ± 4,8              | 70,7 ± 2,9              | 3,85 ± 0,22              |
| Больные до операции (n=8)    | 45,4 ± 2,3 *                            | 57,1 ± 4,9 | 12,1 ± 5,8*             | 56,9 ± 4,9*             | 2,38 ± 0,23*             |
| Больные после операции (n=8) | 33,8 ± 5,0 <sup>Δ</sup>                 | 76,0 ± 4,7 | 42,2 ± 6,8 <sup>Δ</sup> | 81,3 ± 5,8 <sup>Δ</sup> | 4,14 ± 0,29 <sup>Δ</sup> |

Примечание.

Различия показателей достоверны по сравнению с таковыми: \* — у доноров; <sup>Δ</sup> — у больных до операции (p<0,05 - 0,001). То же в табл. 2.

Таблица 2. Метаболическая и фагоцитарная активность НГ у больных в зависимости от индекса НГ/ЛЦ

| Группы обследованных | НГ/ЛЦ       | Величина показателя ( $\bar{x} \pm m$ ) |             |            |             |              |
|----------------------|-------------|---|-------------|------------|-------------|--------------|
|                      |             | Сп НСТ, %                               | Ст НСТ, %   | ПР, %      | ФИ, %       | ФЧ, усл. ед. |
| Доноры (n=21)        |             | 13,6 ± 2,3                              | 63,7 ± 3,0  | 42,5 ± 4,8 | 70,7 ± 2,9  | 3,85 ± 0,22  |
| 1-я (n=4)            | 1,84 ± 0,29 | 28,2 ± 6,6*                             | 37,8 ± 9,6* | 9,5 ± 4,0  | 57,0 ± 4,5  | 2,32 ± 0,18  |
| 2-я (n=4)            | 3,11 ± 0,27 | 62,5 ± 9,0                              | 76,5 ± 8,9  | 14,8 ± 8,7 | 56,8 ± 10,5 | 2,44 ± 0,46  |

по сравнению с исходными величинами.

По данным регрессионного анализа установлена прямая зависимость между количеством формазан—положительных НГ в Сп— и Ст НСТ—тестах ( $r=0,87$ ,  $p=0,005$ ,  $F=18,7$ ) у больных до операции.

Метаболическая и фагоцитарная активность НГ у больных обратно зависела от количества формазан—положительных клеток в Сп НСТ—тесте и ФИ ( $r= - 0,76$ ,  $p=0,03$ ,  $F=8,1$ ).

У здоровых лиц отмечена прямая корреляция между количеством формазан—положительных НГ в Сп НСТ—тесте и ПР в НСТ—тесте ( $r=0,5$ ,  $F=6,0$ ,  $p=0,025$ ), а также между ФИ и ФЧ ( $r=0,48$ ,  $p=0,027$ ,  $F=5,7$ ).

После оперативного лечения больных установлена прямая зависимость между количеством формазан—положительных клеток в Ст НСТ—тесте и ПР ( $r= 0,7$ ,  $p= 0,02$ ,  $F=10,4$ ), а также между ФИ и ФЧ ( $r= 0,75$ ,  $p= 0,03$ ,  $F= 7,9$ ).

Следовательно, после проведенного лечения изменяются корреляционные связи между факторами метаболической активности НГ, а именно возникает их связь с ПР после стимуляции клеток *in vitro*.

Прямая корреляция между ФИ и ФЧ НГ, которую выявляли после лечения больных, свидетельствует о согласованной функции фагоцитарных клеток, поскольку соответствует аналогичной зависимости у здоровых лиц.

Соотношение НГ и лимфоцитов (ЛЦ) является прогностическим фактором у пациентов при ГЦК. Низкий индекс НГ/ЛЦ ассоциирован с положительным прогнозом [14].

В зависимости от его величины пациенты распределены на две группы: 1—я группа с низким (до 2,43), 2—я группа — с высоким (более 2,43) индексом. У больных при низком индексе НГ/ЛЦ отмечено достоверное снижение метаболической активности как в Сп, так и Ст НСТ—тесте (табл. 2), что соответствует меньшему количеству НГ, находящихся в активированном состоянии, мы расцениваем это как допол-

нительный положительный прогностический фактор.

Несмотря на быструю активацию врожденного иммунитета в ответ на проникновение HCV в организм человека, распространение вируса и увеличение его концентрации в сыворотке происходит в течение нескольких суток после инфицирования [15]. Высокую вирусную нагрузку обнаруживают уже в первые дни инфицирования. В основе этого феномена лежит способность HCV включать различные активные и комплементарные механизмы, угнетающие активность врожденного иммунитета [16]. В частности, они блокируют некоторые внутриклеточные сигнальные каскады, необходимые для продукции интерферона I типа и экспрессии гена, стимулируемого интерфероном (ISG); продукт неструктурного гена NS3/4A может блокировать сигнальные пути, индуцируемые Толл—подобным рецептором 3 и RIG—1, которые обеспечивают активацию продукции интерферона I; core протеин (HCV core) может блокировать реакции JAK—STAT сигнального каскада, которые являются важными звеньями в экспрессии ISG. Кроме того, HCV может непосредственно противодействовать специфическим функциям ISG (ингибировать активность протеинкиназы R и 2'—5' олигоденилатсинтазы посредством NS5A и E2), угнетать функцию компонентов врожденного иммунитета — НК—клеток и дендритных клеток. Участие HCV в реакции врожденного иммунного ответа может способствовать нарушению созревания клеток, осуществляющих адаптивный иммунитет, тесно связанных с активностью врожденного иммунитета. Результаты исследований свидетельствуют, что, несмотря на раннее начало репликации HCV, индукция HCV—специфических Т—лимфоцитов происходит через продолжительное время после инфицирования [15].

Выявленные нами изменения функциональных свойств НГ — повышение метаболической активности, уменьшение ее резерва, угнете-

ние фагоцитарных функций у больных при ГЦК свидетельствуют о нарушении реакций врожденного иммунитета, а также коррелятивной зависимости между метаболической и поглотительной активностью НГ. Оперативное вмешательство уже на 7 — 8—е сутки способствует нормализации факторов врожденного иммунитета и восстановлению коррелятивных взаимоотношений.

## ВЫВОДЫ

1. У больных при ГЦК до операции выявлены повышенная метаболическая активность НГ в Сп НСТ—тесте и уменьшение ПР НГ в НСТ—тесте, а также слабая активация поглотительной функции НГ в реакции фагоцитоза (уменьшение ФИ и ФЧ).

2. После хирургического вмешательства наблюдали нормализацию факторов врожденного иммунитета, что проявлялось уменьшением количества формазан—положительных НГ в Сп НСТ—тесте и повышении резерва метаболической активности НГ.

3. Установлена прямая корреляция ФИ и ФЧ в реакции фагоцитоза у больных на 7 — 8—е сутки после операции.

4. До начала лечения у больных при ГЦК установлена прямая зависимость между количеством формазан—положительных НГ в Сп и Ст НСТ—тестах ( $r=0,87$ ) и обратная зависимость между количеством формазан—положительных клеток в Сп НСТ—тесте и ФИ ( $r= - 0,76$ ), тогда как у здоровых лиц отмечена прямая корреляция между количеством формазан—положительных НГ в Сп НСТ—тесте и ПР в НСТ—тесте ( $r=0,5$ ), а также между ФИ и ФЧ ( $r=0,48$ ).

5. После оперативного вмешательства у больных установлена прямая зависимость между количеством формазан—положительных НГ в Ст НСТ—тесте и ПР НГ ( $r= 0,7$ ), а также между ФИ и ФЧ ( $r= 0,75$ ), что свидетельствует о согласованной функции НГ и соответствии аналогичной зависимости у здоровых лиц.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lovet J. M. The Barcelona approach diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma / J. M. Lovet, J. Fuster, J. Bruix // *Liver Transpl.* — 2004. — Vol. 10. — P. 115 — 120.
2. Murray C. J. Mortality by cause for eight regions of the world Global Burden of Disease Study / C. J. Murray, A. D. Lopes // *Lancet.* — 1997. — Vol. 349. — P. 1269 — 1276.
3. Hormonal therapy with megestrol in inoperable hepatocellular carcinoma characterized by variant oestrogen receptors / E. Wille, I. Foretti, A. Grottola [et al.] // *Br. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 84. — P. 881 — 885.
4. Platelets prevent IFN—alpha/beta—induced lethal hemorrhage promoting CTL—dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus / M. Iannacone, G. Sitif, L. M. Isogawa [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — Vol. 105, N 2. — P. 629 — 634.
5. Ивашкин В. Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени / В. Т. Ивашкин // *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* — 2009. — Т. 19, № 2. — С. 8 — 13.
6. Ивашкин В. Т. Иммунная система и повреждения печени при хронических гепатитах В и С / В. Т. Ивашкин // *Там же.* — № 6. — С. 4 — 10.
7. Ивашкин В. Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии / В. Т. Ивашкин // *Там же.* — 2008. — Т. 18, № 4. — С. 4 — 10.
8. Rehermann B. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infection / B. Rehermann, M. Nascimbeni // *Nat. Rev. Immunol.* — 2005. — Vol. 5. — P. 215 — 229.
9. Шмелев Е. И. К оценке теста восстановления нитросинего тетразолия у больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких // Е. И. Шмелев, Т. К. Бумагина, Ю. Г. Митрев // *Лаб. дело.* — 1979. — № 9. — С. 524 — 528.
10. Аутоиммунные болезни и их роль в клинике внутренних болезней / Е. Ф. Чернушенко, Л. В. Когосова, Т. В. Голубка [и др.]. — К.: Здоровья, 1985. — 160 с.
11. Рецепторы врожденного иммунитета: подходы к количественной и функциональной оценке TOLL—подобных рецепторов человека / Л. В. Ковальчук, М. В. Хорева, А. С. Варивода [и др.] // *Иммунология.* — 2008. — № 4. — С. 223 — 231.
12. Сагакянц А. Б. Некоторые аспекты исторического становления теории фагоцитоза (к 100—летию присуждения И. И. Мечникову Нобелевской премии) / А. Б. Сагакянц, Р. М. Хаитов // *Иммунология.* — 2008. — № 4. — С. 196 — 201.
13. Скляр Л. Ф. Система цитокинов и показатели оксидативного стресса при хроническом гепатите С с учетом иммунокорригирующей терапии: автореф. дис. ... д—ра мед. наук / Л. Ф. Скляр. — Владивосток, 2006. — 50 с.
14. Neutrophil—to—lymphocyte ratio acts as a prognostic factor for patients with advanced hepatocellular carcinoma / X. Li, Z. H. Chen, X. K. Ma [et al.] // *Tumour Biol.* — 2014. — Vol. 35, N 11. — P. 11057 — 11063.
15. Wieland S. F Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA—containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice / S. F. Wieland, L. G. Guidotti, F. V. Chisari // *J. Virol.* — 2005. — Vol. 79. — P. 9369 — 9380.
16. Saito T. Regulation of innate immunity against hepatitis C virus infection / T. Saito, M. J. Gale // *Hepatol. Res.* — 2008. — Vol. 38. — P. 115 — 122.

