

## Характеристика клеточного иммунного ответа в зависимости от интенсивности инвазии у больных хроническим описторхозом

Ильинских Е.Н., Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Лепёхин А.В., Юркин А.Ю., Бужак Н.С.

## Characterization of cellular immune response associated with infection intensity in chronic opisthorchiasis patients

Ilyinskikh Ye.N., Ilyinskikh N.N., Ilyinskikh I.N., Lepyokhin A.V., Yurkin A.Yu., Buzhak N.S.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Ильинских Е.Н., Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н. и др.

Проведена оценка реакции бласттрансформации мононуклеаров крови после стимуляции антигенами или митогенами у больных хроническим описторхозом с низкой и высокой интенсивностью инвазии. У больных с высокой интенсивностью инвазии отмечено наиболее выраженное снижение реакции бласттрансформации *in vitro* и содержания CD8<sup>+</sup>- и CD16<sup>+</sup>-клеток в периферической крови.

**Ключевые слова:** описторхоз, *Opisthorchis felineus*, реакция бласттрансформации лимфоцитов, интенсивность инвазии.

The aim of this work was to assess the lymphocyte transforming responses to stimulation with antigens or mitogens in chronic opisthorchiasis patients with low and high degrees of infection intensity. The heavily infected patients demonstrated the lowest levels of stimulated lymphocyte transforming response *in vitro*, and CD8<sup>+</sup> or CD16<sup>+</sup> counts in peripheral blood.

**Key words:** opisthorchiasis, *Opisthorchis felineus*, lymphocyte transformation assay, infection intensity.

УДК 616.995.122.21-036.12-092.19:578.24

### Введение

В России на долю описторхоза, вызванного *Opisthorchis felineus*, ежегодно приходится более 60% от числа всех зарегистрированных биогельминтозов [6]. Известно, что наиболее крупный природный очаг описторхоза связан с Обь-Иртышским речным бассейном в Западной Сибири. Хроническая стадия этого заболевания сопровождается развитием холангиохолецистита и панкреатита. При изучении характера течения инвазии, вызванной *Opisthorchis viverrini* или *O. felineus*, было показано, что выраженность патологических изменений во внутриспеченочных желчных протоках находится в прямой корреляционной зависимости от длительности течения заболевания и интенсивности инвазии [4, 5, 11, 16]. Кроме того, протекающий годами и десятилетиями хронический описторхоз приводит к существенным изменениям в им-

мунном ответе хозяина. При изучении популяционного состава лимфоцитов периферической крови у больных описторхозом большинство исследователей подчеркивают прямую заинтересованность в патогенезе этого заболевания клеточных факторов иммунитета и прежде всего Т-лимфоцитов. Наиболее типичным для описторхоза, вызванного *O. felineus*, являются супрессия Т-клеточного звена и повышение числа В-лимфоцитов [5]. Имеются сведения, что степень изменений показателей иммунного ответа при описторхозе, как правило, коррелирует с тяжестью течения заболевания [5], однако комплексного изучения этих показателей в зависимости от интенсивности инвазии до сих пор не проводилось.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании клеточного иммунного ответа, стимулированного

специфическими гельминтными антигенами, неспецифическими бактериальными антигенами или митогенами, а также популяционного состава лимфоцитов периферической крови у больных хроническим описторхозом в зависимости от интенсивности инвазии.

## Материал и методы

Проведено обследование 87 больных хроническим описторхозом в стадии обострения (возраст  $34,3 \pm 8,1$  года). Диагноз был подтвержден копроовоскопически. Интенсивность инвазии определяли по методу Столла [1]. В зависимости от интенсивности инвазии все больные были распределены на две группы: группу I (42 человека), имевшую низкую интенсивность инвазии (до 1 000 яиц 1 г фекалий), и группу II (45 человек), у которой была выявлена высокая интенсивность инвазии (более 1 000 яиц на 1 г фекалий). Контрольная группа включала 33 клинически здоровых лица, не имевших описторхоза, а также других гельминтных инвазий и вирусных гепатитов В или С (возраст  $30,3 \pm 5,4$  года). Больные описторхозом и контрольная группа были обследованы для исключения у них туберкулеза, а также вирусных гепатитов В и С методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем производства «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

В проведенных исследованиях использовались яичный антиген (ЯАГ) и соматический антиген (САГ) описторхов, которые получали в соответствии с методом, описанным А.Т. Котелкиным и соавт. [3]. Мариты *O. felineus* получали из печени зараженных хомяков. Препарат антигена хранили при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$  в обезвоженном состоянии. В антигене определяли содержание белка по методу Н.О. Lowry и соавт. [10].

Для изучения показателей иммунного статуса использовали гепаринизированную венозную кровь (20 МЕ/мл). Мононуклеары получали центрифугированием лейкоцвези на градиенте плотности фиколла (Pharmacia, Швеция) [7]. Экспрессию мембранных маркеров на лимфоцитах определяли иммунофлюоресцентным методом с помощью моноклональных антител к следующим детерминантам:  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{CD16}^+$ ,  $\text{CD19}^+$ . В работе применялись моноклональные антитела к дифференцировочным антигенам лимфоцитов производства «Сорбент» (г. Москва). Подсчет осуществляли на люминесцентном микроскопе

«Люам» И-2. Устанавливали процент и абсолютное число лимфоцитов, несущих определенные детерминанты.

Для оценки пролиферативной функции мононуклеарных клеток периферической крови с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) были использованы специфические антигены описторхов (ЯАГ и САГ) в дозе 20 мкг/мл, очищенный белковый дериват туберкулина (ОБДТ) (Sigma, США) в дозе 10 мкг/мл, а также митоген фитогемагглютинин (ФГА) в дозе 10 мкг/мл (Difco, США) [8]. Через 96 ч выращивания культуры во флаконы добавляли среду 199 и центрифугировали. Из осадка готовили мазки, которые фиксировали в метаноле, окрашивали по Романовскому—Гимзе. Подсчет 500 клеток производили равномерно через всю площадь мазка, число бластных форм выражали в процентах от общего числа подсчитанных лимфоидных клеток.

Оценку различий между выборками осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия сравниваемых результатов ( $M \pm m$ , где  $M$  — выборочное среднее арифметическое,  $m$  — ошибка среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости  $p < 0,05$  [2].

## Результаты

Результаты фенотипирования субпопуляций лимфоцитов в периферической крови, полученной от больных хроническим описторхозом с различной интенсивностью инвазии и от контрольной группы, приведены в табл. 1. Установлено, что больные как с низкой (группа I), так и с высокой (группа II) интенсивностью инвазии имели достоверное снижение числа  $\text{CD3}^+$ - и  $\text{CD4}^+$ -клеток ( $p < 0,01$ ) по сравнению со здоровыми людьми. Кроме того, в периферической крови у больных описторхозом из группы II по сравнению с контрольными лицами отмечалось существенное снижение числа  $\text{CD8}^+$ - и  $\text{CD16}^+$ -клеток ( $p < 0,01$ ) при одновременном повышении числа  $\text{CD19}^+$ -клеток ( $p < 0,01$ ). Наиболее значительное снижение в числе  $\text{CD3}^+$ -клеток,  $\text{CD8}^+$ -Т-лимфоцитов и  $\text{CD16}^+$ -клеток натуральных киллеров, а также наиболее существенное повышение числа  $\text{CD19}^+$ -В-лимфоцитов было установлено у больных описторхозом с высокой интенсивностью инвазии по сравнению с имевшими низкую интенсивность инвазии ( $p < 0,01$  во всех случаях).

Кроме того, у больных хроническим описторхозом, имеющих различную интенсивность инвазии, проведена оценка реакции бласттрансформации лим-

фоцитов периферической крови на специфические антигены описторхов, микобактериальный антиген и неспецифический митоген.

Таблица 1

Абсолютное ( $10^9/л$ ) и относительное (%) содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови больных хроническим описторхозом с низкой (группа I) и высокой (группа II) интенсивностью инвазии по сравнению с контролем ( $M \pm m$ )

Субпопуляция лимфоцитов		Группа I	Группа II	Контрольная группа
CD3 <sup>+</sup>	%	52,62 ± 1,27*	47,28 ± 1,03* <sup>†</sup>	68,31 ± 2,23
	$10^9/л$	1,21 ± 0,08*	0,93 ± 0,06* <sup>†</sup>	1,61 ± 0,1
CD4 <sup>+</sup>	%	27,51 ± 1,49*	29,20 ± 1,26*	42,31 ± 2,65
	$10^9/л$	0,59 ± 0,06*	0,61 ± 0,05*	0,99 ± 0,08
CD8 <sup>+</sup>	%	24,20 ± 0,75	19,63 ± 0,78* <sup>†</sup>	25,72 ± 0,96
	$10^9/л$	0,54 ± 0,06	0,28 ± 0,05* <sup>†</sup>	0,61 ± 0,07
CD16 <sup>+</sup>	%	14,52 ± 1,09	9,70 ± 0,72* <sup>†</sup>	15,83 ± 0,40
	$10^9/л$	0,33 ± 0,04	0,18 ± 0,03* <sup>†</sup>	0,37 ± 0,05
CD19 <sup>+</sup>	%	13,71 ± 1,48	25,24 ± 1,35* <sup>†</sup>	11,55 ± 0,37
	$10^9/л$	0,31 ± 0,03	0,49 ± 0,04* <sup>†</sup>	0,26 ± 0,04
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		1,13 ± 0,09*	1,49 ± 0,08 <sup>†</sup>	1,66 ± 0,08

\* Достоверность различий показателя у больных описторхозом (в группах I и II) при сравнении с соответствующими значениями показателя в контрольной группе ( $p < 0,01$ ).

<sup>†</sup> Достоверность различий между группами I и II ( $t$ -критерий Стьюдента) ( $p < 0,01$ ).

Таблица 2

Бласттрансформация лимфоцитов периферической крови (%) в ответ на стимуляцию антигенами (ЯАГ, САГ, ОДТ) или митогеном (ФГА) у больных хроническим описторхозом с низкой (группа I) и высокой (группа II) интенсивностью инвазии по сравнению с контролем ( $M \pm m$ )

Стимулятор	Группа I	Группа II	Контрольная группа
ФГА	59,30 ± 3,85**	27,20 ± 2,51* <sup>†</sup>	72,50 ± 4,61
ОДТ	3,42 ± 0,75	0,82 ± 0,05* <sup>†</sup>	4,62 ± 0,93
ЯАГ	17,20 ± 2,14*	3,40 ± 0,63* <sup>†</sup>	1,21 ± 0,08
САГ	20,11 ± 3,05*	5,52 ± 0,86* <sup>†</sup>	1,05 ± 0,10

Примечание. \* —  $p < 0,01$ , \*\* —  $p < 0,05$  — достоверность различий показателя у больных описторхозом (в группах I и II) при сравнении с соответствующими значениями показателя в контрольной группе; <sup>†</sup> —  $p < 0,01$ , <sup>††</sup> —  $p < 0,05$  — достоверность различий между группами I и II ( $t$ -критерий Стьюдента).

Специфические антигены *O. felinus* (ЯАГ и САГ), добавленные в культуры мононуклеарных клеток, полученных от больных описторхозом из групп I и II, вызвали значительную активацию реакции бласттрансформации лимфоцитов по сравнению с культурами здоровых лиц ( $p < 0,01$ ). Вместе с тем уровень бласттрансформации на специфические антигены *O. felinus* (ЯАГ и САГ) у больных из группы II оказался существенно слабее, чем в группе I ( $p < 0,01$ ). Кроме того, в результате проведенного исследования установлено, что реакция бласттрансформации лимфоцитов периферической крови на неспецифический митоген (ФГА), а также на микобактериальный антиген (ОДТ) в группе II была значительно подавлена ( $p < 0,01$  во

всех случаях) по сравнению с соответствующими показателями в группе I и в контроле (табл. 2).

## Обсуждение

Таким образом, в данной работе показано, что уровень бласттрансформации на специфические паразитарные антигены (ЯАГ и САГ) у больных хроническим описторхозом, имевших высокую интенсивность инвазии, был значительно подавлен по сравнению с соответствующим ответом этих клеток у больных с низкой интенсивностью инвазии. Исследования пролиферативного ответа мононуклеарных клеток на стимуляцию специфическими паразитарными антигенами у больных шистосомозом с инвазией *Schistosoma mansoni* или *S. haematobium* показали наличие обратной корре-

ляционной зависимости между пролиферацией клеток и интенсивностью инвазии, что также свидетельствовало о том, что пациенты с менее выраженной степенью инвазии, как правило, имеют более активный лимфо-пролиферативный ответ на антигены гельминтов [9]. Вместе с тем в этих исследованиях не зафиксировано существенных различий в реактивности лимфоцитов в ответ на неспецифические бактериальные антигены (очищенный дериват туберкулина и столбнячный токсин) или митогены между группами больных с различной интенсивностью инвазии [9].

Однако в настоящей работе показано, что высокая интенсивность инвазии у больных хроническим описторхозом сопровождается угнетением реакции бласт-трансформации не только на специфические гельминтные антигены, но и на неспецифический микобактериальный антиген (ОДТ) и митоген (ФГА). Известно, что преобладание цитокинового профиля Т-хелперов типа 2, что считается характерным для хронической стадии гельминтных инвазий, может сопровождаться снижением эффективности вакцинации у больных паразитозами, включая подавление Т-клеточного иммунного ответа на вакцину БЦЖ [12, 14]. У обследованных больных хроническим описторхозом с высокой интенсивностью инвазии, в частности, установлено снижение числа CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, которые ответственны прежде всего за противовирусный и противобактериальный клеточный иммунный ответ.

Показано, что в иммунном статусе у больных хроническим описторхозом абсолютное количество цитотоксических CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов и 0-лимфоцитов достоверно повышается по сравнению с таковым в контроле, тогда как содержание зрелых CD3<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup>-Т-клеток остается низким [5]. По данным этих авторов, наиболее низкое абсолютное содержание Т-лимфоцитов было обнаружено при тяжелом течении описторхозного холецистогепатита. Уровень В-лимфоцитов и титры антител к описторхозному антигену, напротив, оказались выше при тяжелом варианте болезни по сравнению с легким течением. Таким образом, степень изменений показателей иммунного ответа при описторхозе, как правило, коррелирует с тяжестью течения заболевания [5]. В то же время в настоящей работе показано, что у больных хроническим описторхозом, имевших высокую интенсивность инвазии, отмечается достоверное снижение числа CD3<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- и CD16<sup>+</sup>-

клеток в периферической крови при одновременном повышении числа CD19<sup>+</sup>-В-лимфоцитов по сравнению с группой больных с низкой интенсивностью инвазии и здоровыми людьми. Аналогичное исследование иммунного статуса у больных шистосомозом, вызванным *S. mansoni*, также показало снижение числа CD3<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов [13]. При анализе субпопуляций лимфоцитов у больных с тяжелым течением этого гельминтоза и высокой интенсивностью инвазии обнаружено существенное снижение в числе CD8<sup>+</sup>-Т-клеток и одновременное повышение числа циркулирующих В-лимфоцитов по сравнению с другими группами больных [15].

## Выводы

На основании результатов проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Реакция бласттрансформации на специфические паразитарные антигены у больных хроническим описторхозом, имевших высокую интенсивность инвазии, была значительно подавлена по сравнению с соответствующим ответом этих клеток у больных с низкой интенсивностью инвазии.

2. У больных хроническим описторхозом тяжелая инвазия сопровождается угнетением реакции бласт-трансформации не только на специфические гельминтные антигены, но и на неспецифический микобактериальный антиген (ОДТ) и митоген (ФГА).

3. У больных хроническим описторхозом, имевших высокую интенсивность инвазии, отмечается достоверное снижение числа CD3<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- и CD16<sup>+</sup>-клеток в периферической крови при одновременном повышении числа CD19<sup>+</sup>-В-лимфоцитов по сравнению с группой больных с низкой интенсивностью инвазии и здоровыми людьми.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РГНФ (грант 09-06-00937а).*

## Литература

1. Бронштейн А.М., Котова Е.А. Метод изучения интенсивности инвазии // Мед. паразитол. и паразитар. болезни. 1983. № 1. С. 83—84.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
3. Котелкин А.Т., Разумов И.А., Покровский И.В., Локтев В.Б. Сравнительное изучение соматического, экскреторно-секреторного и яичного антигенов *Opisthorchis felinus* // Мед. паразитология и паразитар. болезни. 1997. № 1. С. 12—16.
4. Лепехин А.В., Бужак Н.С., Ратнер Г.М., Васильев Н.В.

- Влияние различных факторов на иммунный статус больных хроническим описторхозом. Сообщение 1. Изменения иммунологических показателей у больных хроническим описторхозом в зависимости от длительности болезни // Мед. паразитология и паразитар. болезни. 1988. № 2. С. 18—21.
5. Степанова Т.Ф. Описторхоз: новый взгляд на инвазионную болезнь, основы клинической реабилитации, методологию крупномасштабных оздоровительных работ. Тюмень: Изд-во ТГУ, 2002. 196 с.
6. Сыслова Т.Г., Цыбина Т.Н., Сидоренко А.Г., Ясинский А.А. Состояние паразитарной заболеваемости населения Российской Федерации в 1999 году // Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2001. № 3. С. 31—35.
7. Тотолян А.А., Балдуева И.А., Бубнова Л.Н. и др. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека // Клинич. лаб. диагностика. 2001. № 8. С. 38—45.
8. Фримель Г., Тарасов А.П. Иммунологические методы. М., 1987. 472 с.
9. De Jesus A.M., Almeida R.P., Bacellar O. et al. Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis // Eur. J. Immunol. 1993. V. 23. P. 152—158.
10. Lowry O.H., Rosenbrough H.J., Farr A.L., Randal R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193, № 4. P. 265—275.
11. Mairiang E., Elkins D.B., Mairiang P. et al. Relationship between intensity of *Opisthorchis viverrini* infection and hepatobiliary disease detected by ultrasonography // J. Gastroenterol. Hepatol. 1992. V. 7, № 1. P. 17—21.
12. Malhotra I., Mungai P., Wamachi A. et al. Helminth- and Bacillus Calmette — Guerin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis // J. Immunol. 1999. V. 162, № 11. P. 6843—6848.
13. Martins-Filho O.A., Dutra W.O., Freeman G.L. et al. Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human schistosomiasis // Scand. J. Immunol. 1997. V. 46, № 3. P. 304—311.
14. Robinson T.M., Nelson R.G., Boyer J.D. Parasitic infection and polarized Th2 immune response can alter a vaccine-induced immune response // DNA Cell Biol. 2003. V. 22, № 6. P. 421—430.
15. Shahat S.A., El-Dhshan M.A., Aissa S.S. Flowcytometric analysis of T-lymphocytes and serum tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels in *Schistosoma mansoni* patients // J. Egypt. Soc. Parasitol. 2007. V. 37, № 3. P. 1065—1074.
16. Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P. et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma // PLoS Med. 2007. V. 4, № 7. P. 201—210.

Поступила в редакцию 09.06.2009 г.

Утверждена к печати 22.12.2009 г.

#### Сведения об авторах

**Е.Н. Ильинских** — д-р мед. наук, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии СибГМУ (г. Томск).

**Н.Н. Ильинских** — д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой биологии и генетики СибГМУ (г. Томск).

**И.Н. Ильинских** — д-р биол. наук, профессор кафедры микробиологии с вирусологией СибГМУ (г. Томск).

**А.В. Лепёхин** — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии СибГМУ (г. Томск).

**А.Ю. Юркин** — канд. мед. наук, доцент кафедры биологии и генетики СибГМУ (г. Томск).

**Н.С. Бужак** — канд. мед. наук, доцент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии СибГМУ (г. Томск).

#### Для корреспонденции

**Ильинских Екатерина Николаевна**, тел. 8 (3822) 41-36-79, e-mail: infconf2009@mail.ru, ilyinskikh@yandex.ru, infectkaf@yandex.ru