

*Iwona Mozer-Lisewska, Grzegorz Dworacki, Elżbieta Kaczmarek,  
Wojciech Służewski, Arleta Kowala-Piaskowska, Magdalena Figlerowicz,  
Mariusz Kaczmarek, Jan Żeromski*

## ZMIANY W OBREBIE SUBPOPULACJI KRWIŃK BIAŁYCH KRWI OBWODOWEJ U DZIECI Z PRZEWLEKŁYM ZAPALENIEM WĄTROBY TYPU C PRZED LECZENIEM PEGYLOWANYM INTEREFERONEM I RYBAWIRYNĄ\*

Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej III Katedry Pediatrii  
Kierownik Kliniki: Wojciech Służewski  
Katedra Immunologii Klinicznej  
Kierownik: Jan Żeromski  
Pracownia Morfometrii i Przetwarzania Obrazów Medycznych  
Katedry Patomorfologii Klinicznej  
Kierownik: Przemysław Majewski

*W pracy przedstawiono wyniki oceny poszerzonego immunofenotypu krwinek białych krwi obwodowej u dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C przy pomocy cytofluorometrii przepływowej.*

*Słowa kluczowe: wzw C, HCV, limfocyty krwi obwodowej, immunofenotyp*  
*Key words: hepatitis C, HCV, blood lymphocytes, immunophenotype*

### WSTĘP

Przewlekłe wirusowe zapalenie typu C jest istotnym problemem zdrowotnym nie tylko u dorosłych ale także u dzieci. Początkowy przebieg kliniczny choroby w tej grupie wieku jest zwykle bezobjawowy. O rozpoznaniu decyduje wykrycie przeciwciał przeciwko białkom wirusa C i wiremia (HCV RNA) we krwi. Współczesne standardy leczenia przeciw-wirusowego obejmujące stosowanie interferonu alfa z analogami nukleozydowymi takimi jak rybawiryna pozwalają na wyleczenie tylko części pacjentów, oceniane na podstawie eliminacji z krwioobiegu wirusowego RNA. Wirus charakteryzuje się bardzo dużą zmiennością, powstawaniem, tzw. pseudogatunków (*quasispecies*) opornych na stosowaną terapię. Ocenia się, że jedynie ok. 30-40% chorych eliminuje wirusa po zakończeniu leczenia (1). W populacji dziecięcej odsetek ten jest zwykle wyższy i ponadto u niektórych dzieci dochodzi do eliminacji wirusa nawet bez leczenia (2). Przyczyny różnic w odpowiedzi na

---

\* Praca wykonana w ramach grantu Komitetu Badań Naukowych nt 2PO5A 069 27.

leczenie u poszczególnych chorych są niejasne. Przypuszcza się, że może to być spowodowane różnym stanem odporności chorego. Patogeneza zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C jest bowiem ściśle związana z odpowiedzią immunologiczną na antygeny wirusa. Peptydy antygenowe wirusa prezentowane limfocytom T CD4<sup>+</sup> przez komórki prezentujące antygen, powodują stymulację układu immunologicznego, co może zarówno sprzyjać eliminacji zakażonych hepatocytów, jak i powodować degradację niezajętego miąższu wątroby. Pobudzenie układu immunologicznego będące następstwem zakażenia wirusowego powoduje zmiany składu subpopulacji krwinek białych a zwłaszcza limfocytów, co znajduje odbicie w składzie komórkowym krwi obwodowej (3).

Celem tej pracy była próba odpowiedzi na pytanie, czy istnieją różnice w obrębie różnych subpopulacji kwinek białych krwi obwodowej u dzieci zakażonych wirusem C w porównaniu z grupą dzieci niezakażonych. Wyjaśnienie tego mogłoby pomóc w znalezieniu czynników predykcyjnych, określających charakter odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe w populacji dziecięcej.

## MATERIAŁ I METODY

Dzieci: Materiał kliniczny obejmował 52 dzieci, w tym 27 chłopców i 25 dziewczynek w wieku od 10 do 17 lat, średnia wieku 13,7 roku. Rozpoznanie przewlekłego zapalenia wątroby zostało potwierdzone w oparciu o przyjęte kryteria serologiczne, określenie wiremii a także na podstawie wyniku patomorfologicznego biopsji wątroby. Wszyscy chorzy zakwalifikowano do terapii przeciwwirusowej interferonem alfa i rybawiryną.

Grupę kontrolną stanowiło 21 dzieci aktualnie hospitalizowanych w tutejszej Klinice z powodu innej patologii jak: padaczka, zapalenie płuc, zakażenia dróg moczowych i inne. W grupie tej wykluczono zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C oraz nadkażenie innymi wirusami hepatotropowymi.

Ocena immunofenotypu krwinek białych: Próbkę krwi w objętości 2 ml, uzyskane przy okazji pobrań do rutynowych badań hematologicznych i biochemicznych, mieszano z roztworem EDTA i niezwłocznie transportowano do Katedry Immunologii Klinicznej AM. Następnie krew mieszano z płynem lizującym dla eliminacji krwinek czerwonych. Uzyskane po dokładnym płukaniu żywe krwinki białe inkubowano z zestawem przeciwciał monoklonalnych przeciwko różnym antygenom różnicowania, znakowanych fluorochromami o różnych kolorach fluorescencji. Obejmowały one następujące swoistości w różnych kombinacjach: CD14/ CD45, CD3, CD2, CD4, CD8, CD28, CD16, CD56, CD19, HLA-DR. Po reakcji komórki płukano i poddawano akwizycji ( $10^{-4}$  komórek) w cytometrze przepływowym FACScan (Becton Dickinson), jak opisano uprzednio (4).

Ocena reakcji: Ocena, przy pomocy programu Cellquest, obejmowała wzajemne stosunki procentowe, a także bezwzględne wartości ilościowe subpopulacji komórek obliczone w oparciu o całkowitą liczbę leukocytów (WBC). Ponadto dla niektórych subpopulacji określano tzw. Średnią Intensywność Fluorescencji (MFI). Wszystkie dane liczbowe poddano analizie statystycznej, stosując nieparametryczny test Manna-Whitneya, a także test dla współczynnika korelacji rang Spearmana ( $r_s$ ) dla znalezienia wzajemnych zależności pomiędzy subpopulacjami komórek, przyjmując graniczny poziom istotności  $p=0,05$ .

## WYNIKI

Zestawienie badanych subpopulacji komórek, w których stwierdzono różnice między obu grupami dzieci w wartościach względnych (odsetkowych) przedstawiono w tabeli I. Z ogólnej liczby 16 ocenianych subpopulacji co najmniej cztery : limfocyty T CD8<sup>+</sup>, limfocyty NKT, limfocyty T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (cytotoksyczne) i komórki CD8<sup>-</sup> CD28<sup>+</sup> (aktywowane) wykazywały istotnie wyższe wartości odsetkowe w grupie dzieci zakażonych wirusem C w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast trzy inne – monocyty, komórki NK i limfocyty T CD4<sup>+</sup> były również podwyższone w grupie HCV<sup>+</sup> ale na granicy istotności (p=0,05). W bezwzględnych wartościach liczbowych jedynie limfocyty T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> były statystycznie liczniejsze w grupie dzieci zakażonych HCV w porównaniu z grupą kontrolną (p<0,05). Natomiast populacja limfocytów TCD8<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup> (aktywowane), a także stosunek limfocytów T CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> były istotnie obniżone w grupie dzieci zakażonych wirusem C w porównaniu z grupą kontrolną (tabela II). Rycina 1 ilustruje reprezentatywny przykład

Tabela I. Istotne różnice immunofenotypu komórek pomiędzy grupą dzieci HCV<sup>+</sup> i HCV<sup>-</sup> w wartościach względnych (odsetkowych)

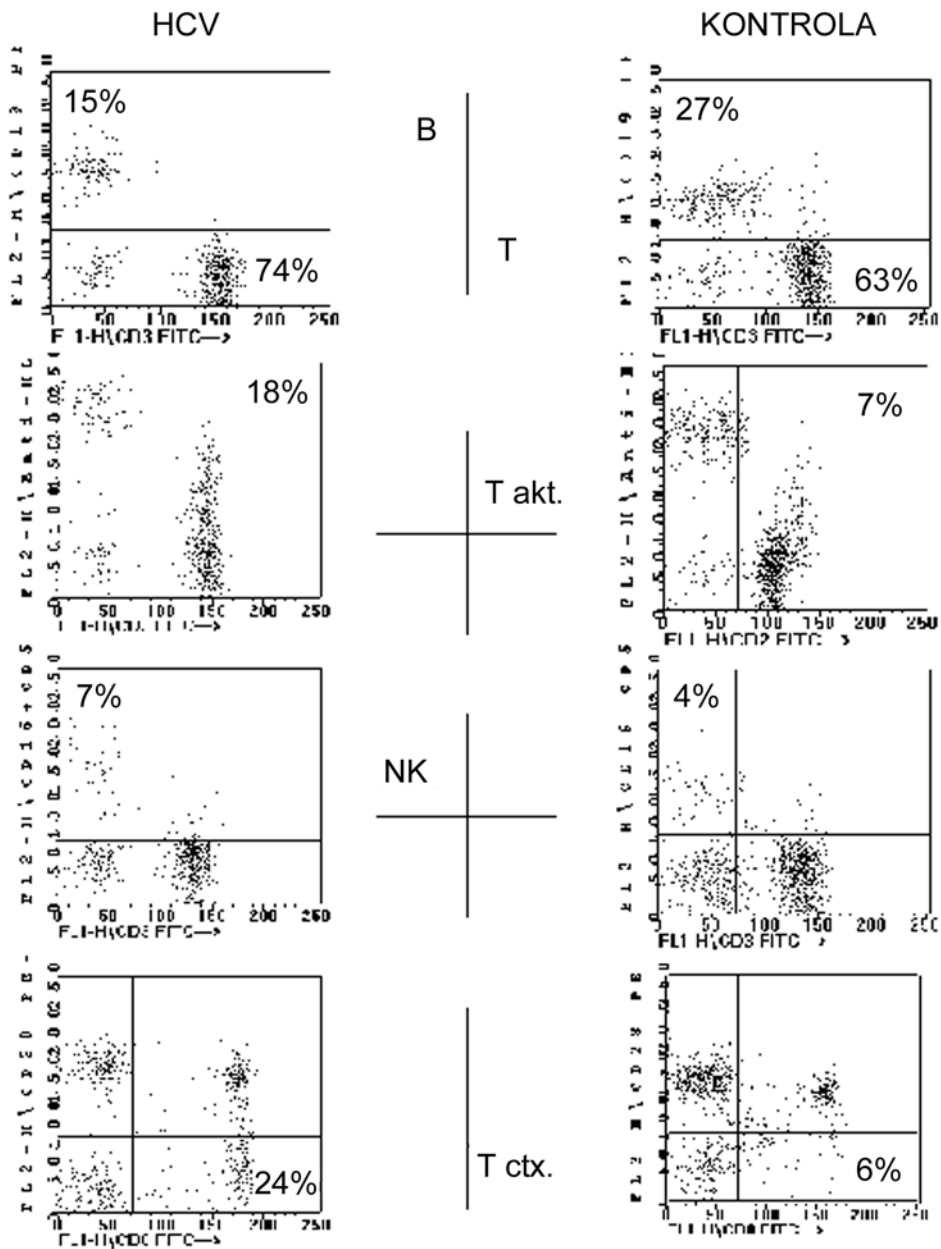
Table I. Significant differences in immunophenotype between HCV<sup>+</sup> and HCV<sup>-</sup> children in relative values

Subpopulacja komórkowa	HCV+			HCV-			Poziom istotności
	średnia	SD	n	średnia	SD	n	
Monocyty	7,0	2,4	52	8,4	3,2	21	p=0,05
Limfocyty T CD4 <sup>+</sup>	32,5	6,8	51	37,0	7,8	21	p=0,05
Limfocyty T CD8 <sup>+</sup>	33,5	7,9	51	28,1	8,0	21	p<0,01
Komórki NK	13,5	7,9	31	8,8	5,0	19	p=0,05
Limfocyty NKT <sup>+</sup>	3,6	3,3	28	2,0	1,4	18	p<0,04
Limf.T CD8 <sup>-</sup> /CD28 <sup>+</sup>	32,4	7,7	29	43,1	7,6	21	p<0,001
Limf.T CD8 <sup>+</sup> /CD28 <sup>-</sup>	11,6	6,6	29	6,8	4,3	21	p<0,004

Tabela II. Istotne różnice immunofenotypu limfocytów pomiędzy grupą dzieci HCV<sup>+</sup> i HCV<sup>-</sup> w wartościach bezwzględnych

Table II. Significant differences in immunophenotype between HCV<sup>+</sup> and HCV<sup>-</sup> children in total values

Subpopulacja komórkowa	HCV			Kontrole			Poziom istotności
	średnia	SD	n	średnia	SD	n	
CD8	711,8	312,1	51	602,8	325,7	21	p<0,01
CD8 <sup>-</sup> /CD28 <sup>+</sup>	629,0	357,8	29	902,1	361,8	21	p<0,005
CD8 <sup>+</sup> /CD28 <sup>-</sup>	227,1	153,0	29	147,1	122,8	21	p<0,04
CD4/CD8	1,03	0,35	51	1,44	0,54	21	p<0,005



Ryc. 1. Reprezentatywne różnice w immunofenotypie pomiędzy chorym z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C a dzieckiem HCV ujemnym

Fig. 1. Representative differences in immunophenotype between patient with chronic hepatitis C and HCV-negative child

różnic w immunofenotypie u chorego dziecka zakażonego HCV w porównaniu z chorym HCV RNA – w tej samej grupie wiekowej.

Ponadto wykryto kilka korelacji pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami w grupie dzieci zakażonych, przy pomocy współczynnika korelacji rang Spearmana ( $r_s$ ).

W wartościach bezwzględnych wszystkie główne subpopulacje komórek jak limfocyty B CD19<sup>+</sup>, komórki NK (CD56<sup>+</sup>), komórki CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> korelowały z liczbą limfocytów T (CD3<sup>+</sup>). Liczba komórek NK korelowała z liczbą aktywowanych limfocytów T (CD28<sup>+</sup>) ale także z liczbą komórek T cytotoksycznych (CD28<sup>-</sup>). W wartościach względnych (odsetkowych) limfocyty (całkowite) wykazywały odwrotną korelację z limfocytami NKT (-0,51). Natomiast średnia intensywność fluorescencji (MFI) monocytów (CD16<sup>+</sup>) wykazywała wysoką korelację z odsetkiem limfocytów T CD3<sup>+</sup> (0,9).

## DYSKUSJA

Wirusowe zapalenia wątroby typu C są częstą chorobą zakaźną w populacji dziecięcej. Ich przebieg nagminnie przechodzi w stan przewlekły, co prawdopodobnie można tłumaczyć zaburzeniami odporności komórkowej, zarówno naturalnej jak i nabytej (5). Wskazuje to na konieczność szczegółowej oceny subpopulacji komórek opartej na ewaluacji ekspresji antygenów różnicowania. Metodą z wyboru jest tu cytofluorymetria przepływowa (4).

Okazało się, że obie grupy dzieci tzn. zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV+) jak i niezakażonych (HCV-) różnią się istotnie pod względem co najmniej trzech do pięciu parametrów i to zarówno w wartościach odsetkowych jak i całkowitych. W grupie dzieci HCV+ wzrastał odsetek limfocytów efektorowych, potencjalnie cytotoksycznych. Obejmował on cytotoksyczne komórki CD8<sup>+</sup>, a zwłaszcza CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, komórki NK (CD56<sup>+</sup>) i limfocyty NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Sugeruje to, że infekcja wirusowa, choć zwykle nie ma klinicznie, zostaje jednak rozpoznana przez układ odpornościowy dziecka i indukuje efektorową odpowiedź komórkową. Wzrost subpopulacji limfocytów CD8<sup>+</sup> u dzieci HCV+ znalazł ponadto odbicie w obniżeniu stosunku limfocytów T (CD4:CD8) w porównaniu do grupy kontrolnej. Znaczenie tego parametru w hepatitis C jest nieznane ale w wirusowym zapaleniu wątroby typu B opisano jego znaczenie predykcyjne sugerujące pomyślny wynik leczenia przeciwwirusowego u dzieci (6).

Inną stwierdzaną zmianą, jednak bez znamienności statystycznej, były zaburzenia odporności humoralnej, manifestujące się spadkiem ilościowym limfocytów B (CD19<sup>+</sup>, CD2-DR<sup>+</sup>) u chorych dzieci. Obserwacja ta różni się od wyników wykazanych u dorosłych pacjentów HCV+, u których występuje częściej wzrost limfocytów B „naiwnych” i bez cech aktywacji (7). Przyczyną tych różnic może być brak pomocy ze strony limfocytów T CD4<sup>+</sup> koniecznej dla wzrostu i różnicowania limfocytów B. U badanych dzieci HCV+ można było bowiem zauważyć spadek liczby limfocytów T CD4<sup>+</sup> a także populacji CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> odpowiadającej komórkom aktywowanym. Wydaje się więc, że aktywacja limfocytów pomocniczych T CD4<sup>+</sup> jest zjawiskiem przejściowym w HCV, przynajmniej u dzieci, wystarczającym jednak do indukcji komórek efektorowych o potencjale cytotoksycznym, ale później zanikającym, być może w wyniku supresyjnego działania wirusa. Wykazano bowiem, że niestrukturalne białko NS3 wirusa C indukuje uwalnianie rodników tlenowych z fagocytów, co prowadzi do zaburzeń czynnościowych a nawet apoptozy limfocytów (8).

Pewne interesujące spostrzeżenia w grupie dzieci HCV+ poczyniono oceniając zależności między badanymi parametrami przy pomocy współczynnika korelacji rang Spearmana ( $r_s$ ). I tak np. wzrost wszystkich subpopulacji limfocytów, włącznie z limfocytami B i komórkami NK kojarzył się ze wzrostem limfocytów T CD3<sup>+</sup>. Jest to oczywiste dla subpopulacji CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, ale w odniesieniu do pozostałych sugeruje wspólny bodziec stymulujący produkcję lub wyrzut z miejsc powstawania komórek. Stwierdzana korelacja pomiędzy limfocytami CD2<sup>+</sup>DR<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> może sugerować, że limfocyty potencjalnie cytotoksyczne są aktywowane. Ekspresja antygenów HLA DR jest bowiem markerem aktywacji limfocytów T.

#### PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przedstawione dane wskazują, że układ odporności komórkowej dziecka zakażonego wirusem C reaguje na istnienie zakażenia. Zmiany składu subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u chorych dzieci są możliwe do wykrycia. Do istotnych należy wzrost efektorowych komórek o potencjale cytotoksycznym i spadek stosunku limfocytów T CD4:CD8. Pozostaje sprawą otwartą, które z opisanych zaburzeń mają znaczenie predykcyjne.

*I Mozer-Lisewska, G Dworacki, E Kaczmarek, W Szłuzewski, A Kowala-Piaskowska,  
M Figlerowicz, M Kaczmarek, J Żeromski*

#### ALTERATIONS WITHIN WHITE BLOOD CELL SUBSETS IN CHILDREN WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C BEFORE TREATMENT WITH PEGYLATED INTERFERON AND RIBAVIRINE

#### SUMMARY

**Objective:** Detection of differences in white blood cell subsets in children with chronic viral hepatitis type C before antiviral treatment.

**Methods:** A cohort of children (n=52) with proven HCV infection were subjected to flow cytometric analysis of their white blood cells and compared to non-infected control group.

**Main observations:** It has been found that the hepatitis group has higher number of cells with cytotoxic potential, decreased CD4/CD8 ratio than the other one.

**Results:** Significant rise of CD8<sup>+</sup>, CD28<sup>-</sup> cells, NK cells and NKT lymphocytes was demonstrated in hepatitis group. Several correlations were noticed between various cell subsets studied in virus C infected children.

**Conclusions:** This data show that HCV infection affects child immunity at systemic level. Cellular alterations are detectable by means of flow cytometry. Evaluation of its parameters might have predictive value in antiviral treatment.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-50.
2. Jonas MM. Children with hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S173-8.
3. Freeman AJ, Marinos G, French RA, i in. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2001;79:515-36.

4. Mozer-Lisewska I, Służewski W, Figlerowicz M, i in. Ocena immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej u dzieci z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B leczonych rekombinowanym preparatem interferonu alfa. *Alergia, Astma, Immunol Klin* 2002;7:44-8.
5. Mozer-Lisewska I. Odporność naturalna (wrodzona) w wirusowych zapaleniach wątroby. *Alergia Astma Immunol* 2004;9:45-7.
6. Genel F, Unal F, Ozgenç F, i in. Decreased ratio of CD4/CD8 lymphocytes might be predictive for successful interferon alpha and lamivudine combined therapy in childhood chronic hepatitis B infection: a preliminary study. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:645-50.
7. Ni J, Hembrador E, Di Bisceglie AM, i in. Accumulation of B lymphocytes with a naïve, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *J Immunol* 2003;170:3429-39.
8. Thoren F, Romey A, Lindh M, i in. A hepatic C virus-encoded nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes. Role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. *J Leukoc Biol* 2004;76:1180-6.

**Adres autora:**

Iwona Mozer-Lisewska  
III Katedra Pediatrii  
Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej AM  
ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań