

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

А.З. Местникова, С.А. Артюшкин, В.К. Артюшкина
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОРАЖЕНИЯ НОСА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

УДК 616.211-005.1

В статье отражена проблема развития носовых кровотечений у лиц с хроническим вирусным гепатитом С. Целью исследования было определение наличия фрагментов вируса HCV в слизистой оболочке носа, изменения местного Т-клеточного иммунитета, выявление морфологических изменений слизистой оболочки носа при хроническом вирусном гепатите С. В результате исследования было выявлено наличие неструктурного белка NS3 HCV, активация местного Т-клеточного иммунитета и метаплазия эпителия слизистой оболочки носа.

Ключевые слова: хронический гепатит С, вирус гепатита С, носовое кровотечение, NS3 белок HCV, метаплазия эпителия, гипокоагуляция.

The article reflects the problem of nasal bleeding in patients with chronic hepatitis C. The purpose of the study was to determine the presence of the HCV virus fragments in nasal mucosa, changes in the local T-cell immunity, detection of morphological changes of the nasal mucosa in chronic viral hepatitis C. The result revealed the presence of HCV nonstructural protein NS3, local activation of T-cell immunity and metaplasia of the epithelium of the nasal mucosa.

Keywords: chronic hepatitis C (HCV), virus of hepatitis C (HCV), nosebleeds, NS3 protein of HCV, epithelial metaplasia, hypocoagulation.

Вирусом гепатита С (HCV) в мире инфицированы около 500 млн. чел. В России число больных хронической формой и носителей гепатита С достигает более 2 млн. чел [8].

Нередко ранним признаком цирроза печени на фоне хронического вирусного гепатита может быть носовое кровотечение [6,11]. Частота встречаемости носового кровотечения при заболевании печени варьирует от 1 до 13,4% [14].

Известно несколько причин развития носовых кровотечений при патологии печени – это нарушения в свертывающей системе, как в сторону гипокоагуляции, вследствие недостаточности синтезирующей функции и снижения витамин К-зависимых факторов свертывания крови II, VII, IX, X, нарушений в сосудисто-тромбоцитарном звене, обусловленных застойными явлениями в системе воротной вены, в том числе гиперспленизмом, и характеризующихся снижением уровня тромбоцитов [5]; так и в сторону гиперкоагуляции, о чем свидетельствуют снижение синтеза плазминогена гепатоцитами и попадание тромбопластиноподобных и тромбоцитактивирующих субстанций в большой круг кровообращения при синдроме портальной гипертензии [7].

К локальным причинам развития можно отнести дистрофические изме-

нения в слизистой оболочке носа (в частности суб- и атрофические процессы) и аномалии развития сосудистой стенки (микроангиоматоз и варикозные расширения), наблюдающиеся при выделении токсических веществ и приводящие к нарушению ангиогенеза [3].

Однако при хроническом вирусном гепатите С (ХГС) имеют место и внепеченочные проявления, например при гепатите С иммунокомплексного генеза, встречающиеся в 19-56% случаев, которые могут появляться раньше, чем со стороны печени. Васкулит при гепатите С связан с иммунными комплексами, поражающими артерии мелкого калибра на коже от петехий до некротических язв. Также могут поражаться почки, суставы, периферическая нервная система, слюнные железы, режелезые, ЖКТ, головной мозг [1].

У пациентов с вирусным гепатитом С в крови достаточно часто определяются Ig G к неструктурному белку NS3 [2], а в связи с тем, что в предыдущих исследованиях [12] рибонуклеиновая кислота (РНК) вируса в слизистой носа не выявлялась, было рассмотрено определение неструктурных белков HCV в слизистой оболочке носа.

Известно, что NS3/4A белок ингибирует активацию комплемента, расщепляя компонент C4, что снижает активность классического пути активации комплемента [13]. Так, Amr El-Shazly и др. при исследовании слизистой оболочки носа не было обнаружено C3b, что исключает поражение иммунными комплексами слизистой оболочки [10].

Материал и методы исследования. Были обследованы 42 чел. в возрасте от 25 до 66 лет (20 мужчин и 22

женщины), с вирусным гепатитом С, из них у 21 была декомпенсированная стадия цирроза печени. Группу контроля составили 30 чел. (18 мужчин и 12 женщин) без патологии печени и вируса гепатита С. Пациенты были разделены на 3 группы по признакам поражения печени и наличия вируса гепатита: 1-я – 21 чел. с хроническим гепатитом С, 2-я – 21 чел. с вирусным циррозом печени и 3-я – 30 чел. группа контроля.

Всем больным проведено полное клиническое обследование: объективный осмотр пациента, лабораторные методы исследования – клинический и биохимический анализы крови, общий анализ мочи, коагулограмма. Исследование свертывающей системы включало: АЧТВ, ПТВ, протромбин по Квику, МНО, фибриноген, уровень тромбоцитов.

Основным скрининговым тестом вирусного гепатита С является определение антител HCV с помощью ИФА. В случае подтверждения диагноза проводится качественное определение HCV-RNA. Для подтверждения цирроза проводили УЗИ брюшной полости, ФГДС, сцинтиграфию печени, КТ брюшной полости, эластографию.

Оториноларингологический осмотр проводился по общепринятой методике с использованием видеоэндоскопического оборудования. При эндоскопическом исследовании полости носа оценивали следующие признаки: состояние слизистой оболочки полости носа, наличие участков субатрофий, признаки носовых кровотечений, расположение сосудов слизистой оболочки носа.

Критериями исключения были: воз-

раст старше 66 лет ввиду инволютивных изменений слизистой оболочки носа, наличие ВИЧ-инфекции, микст-гепатиты, наличие аутоиммунных заболеваний.

У пациентов, после получения информированного согласия, под местной аппликационной анестезией 10%-ным раствором лидокаина проводили забор биоптатов из нижней носовой раковины размером 3*4 мм, открывшееся носовое кровотечение купировалось после анемизации полости носа и прижиганием нитратом серебра в виде «жемчужины». Осложнений после забора материала не было получено ни в одном случае. У группы контроля забор материала проводился во время плановой операции по поводу искривления перегородки носа.

Затем часть биоптата слизистой полости носа фиксировалась в 10%-ном растворе нейтрального забуференного формалина, после чего материал проходил стандартную обработку для изготовления гистологических и иммуногистохимических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 3-5 мкм. Другую часть биопсийного материала помещали в эппендорф, содержащий 0,5 мл стерильного раствора Версена (Биолот) для определения местного субстава лимфоцитов методом проточной цитометрии.

Для микроскопического исследования срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Для выявления коллагеновых волокон и оценки степени фиброза применялось гистохимическое окрашивание по методу Ван Гизон. С помощью гистологического исследования определяли степень выраженности воспалительной инфильтрации слизистой полости носа лимфоцитами, плазматическими клетками, гистиоцитами, нейтрофилами, лейкоцитами, эозинофилами, степень фиброза и атрофии.

Иммуногистохимическое исследование включало в себя определение экспрессии NS3 антигена вируса гепатита С с использованием моноклональных мышиных антител (клон MMM33 производства фирмы Novocastra™ в разведении 1:50). Постановка реакции проводилась непрямым трехступенчатым иммуноферментным LSAB (англ. Labeled streptavidin-biotin, DakoCytomation, LSAB 2 System – HRP) методом визуализации, выявления пероксидазной активности осуществляли с помощью 3,3-диаминобензидина, препараты докрашивали гематоксилином Майера.

Для определения местного субсо-

става лимфоцитов суспензию клеток из биопсийного материала получали с использованием механического дезинтегратора Medimachine (BD). Использовали антитела: HLA DR-FITC, CD4-PE, CD3-ECD, CD56-PC5.5, CD25-PC7, CD8-APC, CD19-APC-AF700, CD45-APC-AF750 (Beckman Coulter). Пробы анализировали на проточном цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter) в многоцветном протоколе.

Полученные в процессе выполнения работы клинические результаты обрабатывались с использованием системы STATISTICA for Windows (версия Лиц. BXXR310F964808FA-V).

Результаты и обсуждение. При анамнестическом опросе пациентов достоверных отличий в частоте развития носовых кровотечений в зависимости от стадии ХГС не получено (табл.1). Однако носовые кровотечения встречаются чаще у лиц, страдающих заболеванием печени, в отличие от группы контроля ($p < 0,001$).

При эндоскопическом осмотре полости носа (табл.2) у пациентов с хроническим вирусным гепатитом и циррозом, по сравнению с группой контроля, преобладают субатрофические процессы слизистой оболочки ($p < 0,001$), сосуды расположены поверхностно, местами оголены ($p < 0,01$), корки в носу встречаются одинаково часто в группе с вирусным гепатитом.

По результатам проведенного коагулологического обследования (табл.3) достоверных отличий между пациентами с хроническим вирусным гепатитом С и группой контроля ($p > 0,05$) нет, то есть функция свертывающей системы не нарушена.

В то же время у пациентов с циррозом печени по сравнению с пациентами групп контроля и с вирусным гепатитом отмечаются снижение уровня протромбина по Квику и удлинение протромбинового времени ($p < 0,01$), указывающие на гипокоагуляцию вследствие нарушения свертывания по внешнему типу. Снижение количества тромбоцитов ($p < 0,01$) свидетельствует о нарушении сосудисто-тромбоцитарного механизма свертывания крови. Из полученных данных коагулограммы следует, что коагулологические нарушения возникают только в терминальных стадиях вирусного гепатита С. Данных за гиперкоагуляцию получено не было.

Было проведено 7 иммуногистохимических исследований микропрепаратов пациентов с хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени на наличие белка NS3, из них у 6 больных обнаружена экспрессия NS3 белка HCV в цитоплазме метаплазированного эпителия и в белково-слизистых железах собственной пластинки слизистой оболочки носа (рис. 1, а, б). Это

Таблица 1

Частота носовых кровотечений у пациентов с ХГС и группы контроля, % (абс.)

	1-я группа, $n=21$	2-я группа, $n=21$	Группа контроля, $n=30$
Поступили с носовым кровотечением	24 (5)	14 (3)	0
Привычные носовые кровотечения	38 (8)	24 (5)	0
Однократные носовые кровотечения	38 (8)	33 (7)	0

Таблица 2

Данные эндоскопического осмотра полости носа пациентов с ХГС, % (абс.)

	1-я группа	2-я группа	Группа контроля
Субатрофия слизистой оболочки носа	67 (14)	67 (34)	0
Поверхностное расположение сосудов слизистой носа	43 (9)	43 (9)	7 (2)
Извитые сосуды слизистой оболочки носа	5 (1)	0	3 (1)
Корки в носу	62 (13)	57 (12)	10 (2)
Искривление перегородки носа	57 (12)	43 (9)	100 (30)

Таблица 3

Показатели свертывающей системы крови у пациентов

Показатель	1-я группа	2-я группа	Группа контроля	Референтные значения
Протромбин по Квику, %	97,90±3,13	68,08±7,76	101,09±3,16	70-120
Фибриноген, мг/дл	367,32±24,11	246,45±26,75	415,83±19,39	200-400
АЧТВ, сек	29,35±0,7	32,52±1,1	27,24±0,38	25-33
Протромбиновое время, сек	12,47±0,2	21,23±6,62	11,83±0,025	11-16
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л	226,90±29,28	136,10±23,06	253,83±9,43	160-320

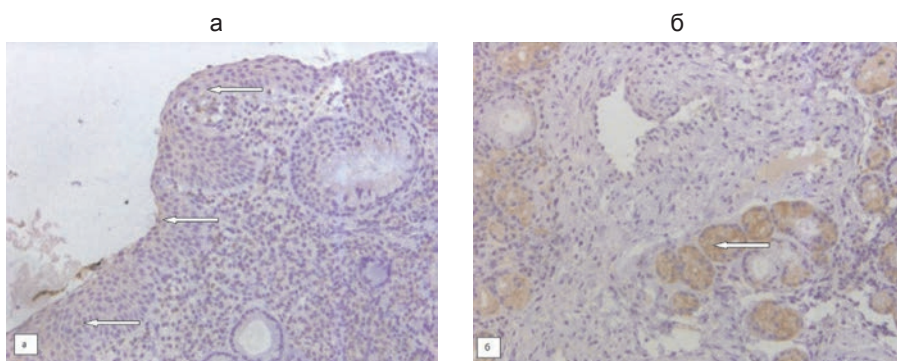


Рис. 1. Слизистая носа. Экспрессия NS3 антигена в: а) метаплазированном эпителии; б) слизистых железах. Иммуногистохимическое исследование. Увеличение 200

Таблица 4

Параметры клеточного звена иммунитета в биоптате у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С и в группе контроля

Показатель	ХГС, М±m, n=6	Группа контроля, М±m, n=6
CD3+ (Т-лимфоциты)	87,8±2,36	85,2±3,96
CD3+CD4+ (Т-хелперы)	26,3±7,31	33,4±1,69
CD3+CD8+ (Т-киллеры)	59,83±8,72	49,8±3,99
Соотн CD4/CD8	0,63±0,27	0,67±0,07
CD3+CD56+ (ТНК-клетки)	8,05±3,49	6,62±1,44
CD19+ (В-лимфоциты)	2,22±0,69	5,2±1,77
CD 25+ (рецептор ИЛ-2)	1,37±0,68	3,68±1,13
CD3+25+	1±0,48	3,32±1,1
CD3-CD8+ (активиров. NK-клетки)	1,57±0,77	1,78±0,78
CD3-CD56+ (NK-клетки)	8±1,55	8,1±3,06
HLA DR+	35,53±6,64	18,2±2,25
CD3+HLA DR+ (активир. Т-клетки)	26,6±9,34	11,68±2,29
CD56+HLA DR+ (активир. NK-клетки)	6,43±1,54	2,82±0,37

Таблица 5

Параметры клеточного звена иммунитета в биоптате слизистой носа и сыворотке крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С

Показатель	В слизистой носа, n=6	В сыворотке крови, n=8
CD3+ (Т-лимфоциты)	87,8±2,36	75,38±9,88
CD3+CD4+ (Т-хелперы)	26,3±7,31	47,38±3,05
CD3+CD8+ (Т-киллеры)	59,83±8,72	26,36±3,66
CD3+CD56+ (ТНК-клетки)	8,05±3,49	9,1±2,33
CD19+ (В-лимфоциты)	2,22±0,69	10,6±1,6
CD 25+ (рецептор ИЛ-2)	1,37±0,68	4,68±0,63
CD3+25+	1±0,48	3,88±0,58
CD3-CD8+ (активиров. NK-клетки)	1,57±0,77	4,88±0,88
CD3-CD56+ (NK-клетки)	8±1,55	12,75±1,99
HLA DR+	35,53±6,64	21,38±3,53
CD3+HLA DR+ (активир. Т-клетки)	26,6±9,34	9,16±2,39
CD56+HLA DR+ (активир. NK-клетки)	6,43±1,54	2,33±0,69

подтверждает наличие неструктурных фрагментов вируса HCV в самой слизистой оболочке носа и не исключает проявление носовых кровотечений как результат внепеченочного проявления вирусного гепатита.

При определении местного субпопуляционного состава лимфоцитов в слизистой оболочке носа было получено преобладание Т-клеточного состава над В-лимфоцитами, что подтверждает доминирование клеточного иммунитета над гуморальным в слизистой

оболочке носа (табл.4). Повышение при вирусном гепатите С Т-киллеров, CD3+HLA DR+, CD56+HLA DR+ ($p<0,05$) в сравнении с нормой свидетельствует о поздней активации Т-лимфоцитов с преобладанием Т-клеточного иммунитета, что свойственно для хронической персистирующей инфекции, в то время как снижение Т-хелперов ($p<0,05$) свидетельствует об ослаблении регуляторных процессов над клеточным иммунитетом. Высокая степень хронизации HCV-ин-

фекции связана с низким содержанием CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, слабой иммуногенностью вирусных белков и способностью к мутациям [4]. Также у пациентов с ХГС по сравнению с группой контроля снижено содержание CD25+ ($p<0,05$) – маркера рецептора ИЛ-2, что свидетельствует о ранней активации клеточного иммунитета.

При сравнении Т-клеточного иммунитета слизистой носа и сыворотки крови (табл.5) определяется преобладание в первом случае Т-лимфоцитов, Т-киллеров, CD56+HLA DR+ ($p<0,01$), что указывает на активацию Т-клеточного иммунитета с активацией Т-киллеров и NK-клеток, а снижение раннего активационного маркера CD3+CD25+ ($p<0,01$) в биоптате подтверждает наличие вируса и длительной персистенции в слизистой носа. В сыворотке крови В-клеточный иммунитет ($p<0,01$) более выражен, однако с учетом того, что происходит постоянная антигенная вариация вируса, выработанные антитела теряют свою актуальность и тем самым вирус ускользает от контроля гуморальной иммунной системы, поэтому наиболее актуальным в изучении элиминации вируса является Т-клеточное звено. Также в сыворотке крови повышена Т-хелперная активность ($p<0,01$), что обуславливает повышенную регуляторную и распознавательную активность, в связи с нагрузкой на иммунную систему.

Наличие NS3 белка HCV и повышение Т-киллеров, активированных Т-лимфоцитов и NK-клеток в слизистой оболочке носа при вирусном гепатите С можно трактовать как результат повреждающего действия Тхелпер-1 опосредованного пути иммунного ответа, где презентация антигенов на поверхности поврежденной клетки, в данном случае в эпителии слизистой оболочки и желез собственной пластинки, вызывает активацию CD8+ лимфоцитов [9].

При гистологическом обследовании у пациентов с вирусным гепатитом по сравнению с группой контроля обнаружена метаплазия эпителия слизистой оболочки носа ($p<0,05$) (табл. 6), причем преобладает метаплазия в многослойный плоский эпителий (рис. 2), что в последующем может привести к атрофическим процессам слизистой оболочки. Атрофические процессы ($p<<0,01$) в 57% (4) случаев были слабо выражены в 1-й группе и ярко выражены у 43% (3) пациентов 2-й группы. Умеренные и выраженные явления фиброза ($p<0,001$) проявляются в обе-

Таблица 6

Оценка метаплазии эпителия
слизистой оболочки носа, % (абс.)

Мета- плазия эпителия	1-я груп- па, n=7	2-я груп- па, n=7	Группа контроля, n=6
Нет	43 (3)	0	83 (5)
ДПер	0	14 (1)	0
ДПл	14 (1)	72 (5)	0
ОПл	43 (3)	14 (1)	17 (1)

Примечание. ДПер – диффузная переход-
ноклеточная метаплазия эпителия; ДПл
– диффузная плоскоклеточная; ОПл – оча-
говая плоскоклеточная.

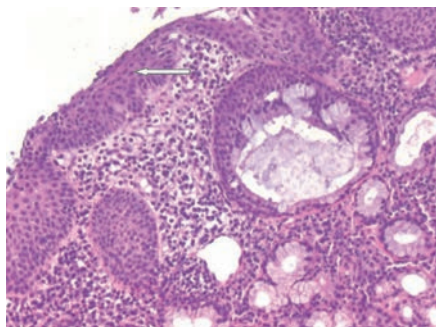


Рис. 1. Слизистая носа. Диффузная плоскоклеточная метаплазия эпителия. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200

их группах одинаково в 86% (6) случаев. Определяется взаимосвязь: чем сильнее выражены явления фиброза и атрофии слизистой оболочки, тем меньше сосудов в слизистой оболочке. Количество сосудов в слизистой оболочке значительно снижено ($P < 0,001$) как при хроническом вирусном гепатите, так и в стадии цирроза. При вирусном гепатите С преобладает лимфо-плазмочитарная инфильтрация стромы слизистой оболочки ($p < 0,01$).

Выводы

1. Носовые кровотечения чаще встречаются у лиц с персистенцией HCV, независимо от стадии заболевания, несмотря на нарушение свертывания крови по типу гипокоагуляции в стадии цирроза печени. Данный факт

указывает, что нарушение коагуляции является неосновной причиной развития носовых кровотечений.

2. У пациентов с хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени в эпителии слизистой оболочки и белково-слизистых железах собственной пластинки слизистой оболочки носа выявлены белки NS3 HCV, что свидетельствует о наличии вируса гепатита С в носу и не исключает секреции его в полость носа.

3. Наличие фрагмента NS3 HCV способствует активации местного Т-клеточного иммунитета с повышением Т-киллеров, NK-клеток при вирусном гепатите С.

4. Метаплазия эпителия слизистой оболочки носа может быть обусловлена наличием NS3 белка HCV в результате повышенной активности Т-клеток. А изменение поверхностного слоя может привести к поверхностному расположению сосудов, из которых происходят носовые кровотечения.

Литература

- Байкова Т.А. Многообразие внепеченочных проявлений хронических вирусных гепатитов В и С, общие принципы лечения / Т.А. Байкова, Т.Н. Лопаткина // Терапевтический архив. – 2013. – №4. – С. 106-107.
- Baykova T.A. The variety of extrahepatic manifestations of chronic viral hepatitis B and C, the general principles of treatment / T.A. Baykova, T.N. Lopatkina // Therapeutic archive. – 2013. – №4. – P. 106-107.
- Баранов А.В. Содержание антител класса Ig G к NS3, NS4 и NS5-антигенам вируса гепатита С и РНК HCV в сыворотках крови больных с латентным течением хронического гепатита / А.В. Баранов, Л.В. Мишкина // Фундаментальные исследования: мат-лы конф. – М., 2008. – №1. – С. 98-99.
- Baranov A.V. The contents of class Ig G antibodies to NS3, NS4 and NS5-antigens of the hepatitis C virus and HCV RNA in the serum of patients with latent chronic hepatitis / A.V. Baranov, L.V. Shishkina // Basic research: Conference materials. – M. – 2008. – №1. – P. 98-99.
- Волков А.Г. Носовые кровотечения / А.Г. Волков, Н.В. Бойко, В.В. Киселев. – М.: Джагар, 2002. – 270 с.
- Volkov A.G. Nosebleeds / A.G. Volkov, N.V. Boyko, V.V. Kiselev. – M.: Jagar. – 2002. – 270 p.
- Дуданова О.П. Хронический вирусный гепатит С: диагностика и особенности клинического течения / О.П. Дуданова, О.И. Киселев. – Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2013. – 112 с.
- Dudanova O.P. Chronic hepatitis C: diagnosis and clinical features / O.P. Dudanova, O.I. Kiselev. – Petrozavodsk: Petrozavodsk State University Publishing House, 2013. – 112 p.
- Пальчун В.Т. Национальное руководство по оториноларингологии / В.Т. Пальчун. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2009. – 960 с.
- Palchun V.T. National manual of otorhinolaryngology / V.T. Palchun. – GEOTAR-Med, 2009. 960 p.
- Пальчун В.Т. Оториноларингология. Клинические рекомендации / В.Т. Пальчун, А.И. Крюков. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 368 с.
- Palchun V.T. Otorhinolaryngology. Clinical recommendations / V.T. Palchun, A.I. Kryukov. – M.: GEOTAR Media, 2013. – 368 p.
- Петров В.В. Актуальные вопросы патогенеза носовых кровотечений / В.В. Петров // Клиническая медицина. – 2006. – Т.84, №4. – С.13-17.
- Petrov V.V. Actual questions of pathogenesis of nasal hemorrhage/ V.V. Petrov // Clinical Medicine. – 2006. – V.84. (4). – P.13-17.
- Радченко В.Г. Оптимизация этиопатогенетической терапии хронического гепатита С / В.Г. Радченко, В.В. Стельмах, В.К. Козлов. – СПб: Тактик-Студио, 2004. – 166 с.
- Radchenko V.G. Optimization of etiopathogenetic therapy of chronic hepatitis C / V.G. Radchenko, V.V. Stelmach, V.K. Kozlov. – St. Petersburg: Tactic studio, 2004. – 166 p.
- Основы клинической иммунологии: перевод с англ. /Чепель Э. [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 416 с.
- Fundamentals of Clinical Immunology: translated from English / E. Chepel [et al.]. – M.: GEOTAR Media, 2008. – 416 p.
- Characterization of hepatitis C virus-induced nasal mucosa remodelling / Amr El-Shazly [et al.] // Histopathology. – 2010. – Vol. 57. – N3. – P. 488-492.
- Epistaxis as an initial sign of hepatic disease/ Barrio J. [et al.] // An Pediatr (Barc) - 2009 Vol. 70. - Issue 6. - P. 599-601.
- Hepatitis C virus induces nasal epithelial erosion and sub-epithelial rhinitis / Abbas F. [et al.] // Rhinology. – 2009. – Vol. 47. – №4. – P.438-443.
- Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4 / Mawatari S. [et al.] // PLoS One. – 2013. – 8 (12).
- Urvashi R. Epistaxis: Study of aetiology, site and side of bleeding / R. Urvashi, R. Zada, V.N. Chaturvedi // Indian Journal of Medical Science. -1999. – Vol.53. - Issue 12. - P.545-552.