

# EVALUAREA COMPARATIVĂ A SUBPOPULAȚIILOR LIMFOCITARE T ÎN SÂNGELE PERIFERIC ȘI ÎN PARENCHIMUL HEPATIC, ÎN HEPATITELE CRONICE CU HBV ȘI HCV

Carmen Ardeleanu<sup>1</sup>, M. Ceaușu<sup>2</sup>, C. Ursaciuc<sup>3</sup>, Florina Vasilescu<sup>4</sup>, Cristina Iosif<sup>5</sup>, Florica Stăniceanu<sup>6</sup>, Camelia Vrabie<sup>7</sup>, Maria Sajin<sup>8</sup>, Dan Butur<sup>9</sup>, Georgeta Butur<sup>10</sup>

## REZUMAT

Introducere: Populațiile limfocitare T par să fie implicate în evoluția și imunopatogeneza hepatitei cu virus C și B în condițiile în care controlează și elimină virusul din celulele infectate, direct prin acțiunea limfocitelor CD8+ sau indirect prin intermediul limfocitelor CD4+.

Scop: Evaluarea comparativă a subpopulațiilor de limfocite T în sângele periferic și în parenchimul hepatic la pacienți infectați cronic cu HBV și HCV.

Material și metode: S-au evaluat celulele CD4+ și CD8+ prin metodele de citometrie în flux și imunohistochimie la 15 pacienți cu hepatită cronică B și 38 pacienți cu hepatită cronică C confirmați serologic.

Rezultate: În sângele periferic, limfocitele T CD4+ au avut valori crescute în hepatitele cronice cu virus B (70% din pacienți) și valorile normale/ușor crescute în hepatitele cronice cu virus C (48% și respectiv 39% din pacienți). Limfocitele CD8+ au prezentat o diminuare semnificativă în ambele tipuri de infecții virale cronice (peste 80% din pacienți). În parenchimul hepatic, analiza cantitativă a subpopulațiilor de limfocite CD4+ a evidențiat un număr redus de celule mai ales în cazul hepatitelor cronice cu VHB (90% pacienți). În hepatitele cronice cu VHC s-au observat în peste 40% din cazuri un număr crescut al limfocitelor CD4+. Evaluarea cantitativă a subpopulației de limfocite CD8+ a relevat un număr crescut de celule în infecțiile cronice cu VHB (50% pacienți), în timp ce numărul acestora a fost scăzut în infecțiile cu VHC (80% pacienți).

Concluzii: Dezechilibrul distribuției subpopulațiilor limfocitare mai ales al celulelor CD8+ în sângele periferic și în parenchimul hepatic poate fi expresia unui răspuns imun antiviral slab ce corespunde unei incapacități de eradicare a virusurilor hepatitice. Această deviație imună facilitează progresia leziunilor hepatice în special în cazul hepatitei cu VHC.

**Cuvinte cheie:** subpopulații limfocitare, CD4+ și CD8+, hepatite cronice B și C, imunohistochimie, citometrie în flux

## ABSTRACT

### Comparative assessment of T lymphocytes subpopulations in peripheral blood and hepatic parenchyma in chronic hepatitis with HBV and HCV

Background: T lymphocytes population are hypothesized to be involved in the evolution and immunopathogenesis of CVH, since they control and eliminate viruses from infected cells, directly through CD8+ T lymphocytes and indirectly by CD4+ T lymphocytes.

Aim: Comparative assessment of T lymphocytes subpopulations in peripheral blood and hepatic parenchyma in patients infected with HBV and HCV.

Material and methods: CD4+ and CD8+ cells were assessed by flow cytometry and immunohistochemistry methods in 15 patients with chronic B hepatitis and 38 patients with chronic C hepatitis serologically confirmed.

Results: In peripheral blood, CD4+ T lymphocytes had increased values in B virus chronic hepatitis (70% of patients) and normal / slightly increased values in C virus chronic hepatitis (48% and 39% of patients). CD8+ lymphocytes presented a significant decrease in both types of chronic viral infections (over 80% of patients).

In hepatic parenchyma, quantitative analysis of CD4+ lymphocytes emphasized a low number of cells, especially for HBV chronic hepatitis (90% of patients). In HCV chronic hepatitis, an increased number of CD4+ cells were observed in over 40% of cases. Quantitative assessment of CD8+ lymphocytes revealed an increased number of cells in chronic infections with HBV (50% of patients), while it was decreased in HCV infections (80% of patients).

Conclusion: The imbalance of lymphocytes subpopulations, especially CD8+ cells in peripheral blood may be the expression of a weak antiviral immune response, with a corresponding inability to eradicate virus. This immune deviation facilitates liver damage, especially in HCV infections.

**Key words:** lymphocytes subpopulations, CD4+ and CD8+, chronic hepatitis HBV and HCV, immunohistochemistry, flow cytometry

<sup>1</sup> Conf. Dr. CPI Carmen Ardeleanu, UMF "Carol Davila", INCD „Victor Babeș” București

<sup>2</sup> As. Univ. Dr. CS Mihai Ceaușu, UMF "Carol Davila", INCD „Victor Babeș” București

<sup>3</sup> Dr. CPII Cornel Ursaciuc, INCD „Victor Babeș”, București

<sup>4</sup> Dr. Florina Vasilescu, INCD „Victor Babeș” București, SMC-Serviciul Anatomie Patologică, București

<sup>5</sup> Dr. Cristina Iosif, INCD „Victor Babeș” București, Sp. "Sfânta Maria", București

<sup>6</sup> Prof. Dr. Florica Stăniceanu, UMF "Carol Davila", Sp. Clinic Colentina - Serviciul Anatomie Patologică, București

<sup>7</sup> Dr. As. Univ. Camelia Vrabie, Sp. Clinic „Sf. Ioan”, UMF "Carol Davila" București

<sup>8</sup> Conf. Dr. Maria Sajin, UMF „Carol Davila”, INCD „Victor Babeș”, București

<sup>9</sup> Bioch. Dan Butur, INCD „I. Cantacuzino”, București

<sup>10</sup> Biol. CPIII Georgeta Butur, INCD „Victor Babeș” București

## INTRODUCERE

Hepatitele cronice virale, determinate în principal de infecțiile cu virusurile hepatotrope B (HBV), C (HCV) și delta (HDV) reprezintă în continuare, pe plan național și internațional, o problemă majoră de sănătate publică, datorită procentului semnificativ de morbiditate și mortalitate.[18;22] Actualmente există suficiente dovezi privind caracterul non-citopatic al HBV, HCV și HDV, iar modificările lezionale, ireversibile ale parenchimului hepatic tind să fie atribuite în mare parte răspunsului imun anti-viral.

Sunt menționate numeroase studii privind infecțiile cu HBV, în care s-a dovedit că răspunsul imun antiviral este principala cauză a eliminării virusului și/sau a gradului de severitate a hepatitei.[3;7;27] Referitor la răspunsul imun, în infecțiile cu HBV și HCV au fost semnalate similitudini, însă rata mult mai mare a persistenței infecției cu HCV, precum și faptul că anticorpii neutralizați nu sunt protectori sugerează existența unor diferențe semnificative ale răspunsului imun în funcție de tipul virusului hepatitic infectant.[12] Astfel, în contextul cunoștințelor actuale privind mecanismele imunologice implicate în mediere a leziunilor hepatice induse de virusurile hepatotrope se poate afirma, că în general, inflamația de la nivelul ficatului asociată infecțiilor cronice se datorează unui dezechilibru între 2 tipuri de răspunsuri imune antivirale, ce ar putea fi atribuite unuia sau mai multor subseturi de celule T.

- 1 Răspunsul imun antiviral eficient - cu rezultat pozitiv
  - are ca efect eliminarea virusului și supresia leziunilor hepatice
2. Răspunsul imun antiviral ineficient - cu rezultat negativ
  - permite creșterea replicării virale și/sau inducerea leziunilor hepatice

- În cazul răspunsului eficient, se constată un răspuns viguros policlonal și multispecific TH (T Helper) și CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) față de epitopii virusurilor. Acesta coincide cu nivelul maxim de alaninaminotransferaze care precede eliminarea antigenelor și dezvoltarea anticorpilor neutralizanți. Odată cu recunoașterea peptidelor virale de pe celulele infectate cu virusurile hepatice, limfocitele CD8+ dobândesc capacități de:

- vindecare a celulei infectate via mecanisme non-citopactice prin inhibarea replicării virusului mediată de citokine [13;16] și
- distrugere a celulelor infectate via perforină-Fas ligand și TNFalfa - utilizând calea apoptozei.[36]

Ambele mecanisme au fost observate în cazul infecțiilor virale vindecate.

- Al 2-lea tip de răspuns imun celular antiviral este cel ineficient care are ca rezultat instalarea infecției persistente cronice. În acest caz răspunsul imun specific anti-antigene virale, este inițial redus sau nedetectabil în sângele periferic. Subpopulațiile de limfocite implicate sunt de tip Th 2, și CTL care sunt caracterizate printr-un răspuns relativ slab, mult mai limitat și în mare parte nespecific față de antigenele virale.[6]

Existența unui echilibru între cele două tipuri de răspuns imun, eficient și ineficient poate asigura protecția imună. Crearea unui dezechilibru al acestei balanțe în favoarea unuia dintre cele 2 tipuri de răspuns imun are ca rezultat în caz pozitiv, o eliminare a virusului cu vindecarea pacientului

sau în caz negativ, toleranța imunologică față de virus cu instalarea infecției cronice.

În cazul infecțiilor cronice la care încărcarea virală este mare și leziunile hepatice sunt severe există încă multe aspecte neclare privind statusul funcțional al celulelor T de la nivel hepatic (care răspund la Ag virale); se pune întrebarea ce factori sau mecanisme le determină pe aceste limfocite T specifice să exercite un control ineficient în pofida prezenței acestora la nivel hepatic într-un număr suficient de mare, dacă aceste celule sunt inhibitate sau dacă efectul lor este insuficient datorită predominanței unui tip de celule T "bystander" (nonspecifice/ neimplicate).[17;27] Ar fi posibil ca aceste celule nonspecifice să modifice balanta răspunsului imun prin intermediul citokinelor, într-un mod nefavorabil sau ar putea pur și simplu să fie "inactive" la unii dintre pacienți. Mai mult, nu sunt încă elucidate unele aspecte privind fenotipul, specificitatea și funcția limfocitelor T intrahepatice, care nu reacționează cu antigenele virale. Acestea ar putea fi într-o măsură mai mare sau mai mică limfocite T "spectatoare" (inactive/neimplicate) în timpul infecției, care pot însă exprima chemokinele CCR5, cu rol chemotactic, eventual de colonizare limfocitară la nivel hepatic. [10;11;35;37] Există încă multe semne de întrebare privind modul în care aceste celule T sunt colonizate la nivelul ficatului într-un număr mai mare sau mai mic, factorii care le determină să nu devină celule activate în timpul infecțiilor virale, perioada de viață și soarta celulelor T activate (specifice antigenului viral) din ficat.

Studiul de față a avut ca scop evaluarea comparativă a celor două subpopulații limfocite TH (CD4+), TS/C (CD8+) cu rol importante în răspunsul imun celular antiviral la nivelul parenchimului hepatic și în sângele periferic la pacienți cu hepatite cronice cu VHB și VHC.

## MATERIAL ȘI METODE

Lotul studiat a fost reprezentat de 82 de pacienți proveniți de la Spitalul Universitar de Urgență București, Spitalul Clinic de Urgență "Sfântul Ioan" și Institutul de Boli Infecțioase "Prof. Dr. Matei Balș". S-au recoltat probe de sânge periferic de la pacienți cu hepatite cronice cu etiologie virală și de la donori sănătoși pentru analiza prin citometrie în flux a limfocitelor T (CD3+), TH (CD4+), TS/C (CD8+). De asemenea, s-au recoltat și punctii hepatice pentru evaluarea fenotipul limfocitelor intrahepatice (subtipuri de celule T - CD4+ și CD8+) prin metoda imunohistochimică (IHC). Selecția pacienților s-a realizat pe baza criteriilor clinice și a markerilor virali serici.

### Identificarea markerilor virali serici

Pentru analiza serologică a markerilor virali s-au utilizat tehnici imunoenzimatică, tip ELISA, atât la identificarea markerilor hepatitici B / C / D, cât și la confirmare. Au fost testați următorii markeri serici: AgHBs, AchBs, AchBc IgG, AchBc IgM, AgHBe, AchBe (infecția cu VHB); Ag core HCV, Ac HCV (infecția cu VHC); AgHD, AcHD IgM, AcHD IgG (infecția cu VHD).

### Analiza prin citometrie în flux

Subpopulațiile limfocitare din sânge periferic total au fost determinate prin citometrie în flux.

S-a utilizat Kit-ul IMK Lymphocyte, MultiSET, Beckton Dickinson și citometrul în flux Beckton – Dickinson (**Tabel I**).

**Tabel I** Fenotiparea populațiilor și subpopulațiilor de limfocite din sângele periferic

POPULAȚII ȘI SUBPOPULAȚII LIMFOCITARE	MARKERI CELULARI
limfocite T totale	CD3
limfocite T ajutoare	CD3/CD4
limfocite T supresoare (citotoxice)	CD3/ CD8

S-au folosit câte 20 $\mu$ l de anticorpi monoclonali specifici pentru markerul celular de interes peste care se adaugă 50 $\mu$ l din sângele pacientului. Probele se incubează 15 minute, la temperatura camerei și se reiau în 450 $\mu$ l fixator după care urmează analiza flow-citometrică. Citirea și prelucrarea probelor se realizează în aceeași zi cu ajutorul programului Multiset.

### Analiza imunohistochimică

Pentru evidențierea imunohistochimică (IHC) a subpopulațiilor limfocitare din țesutul hepatic metoda utilizată a fost cea indirectă trîstadială Avidină-Biotină-Peroxidază Complex (ABC).

Tehnica s-a aplicat pe fragmentele de puncție biopsie hepatică incluse în parafină. Secțiunile inhibate pentru peroxidaza endogenă și apoi tratate cu ser normal, au fost incubate peste noapte la temperatura camerei cu anticorpii primari în diluțiile specifice de lucru.

În ziua a 2-a, după adăugarea pe secțiuni a anticorpii secundar a urmat tratarea cu complexul ABC (kit LSAB+, DAKO, Danemarca). Nucleii au fost contracolorați cu hemalaun Meyer.

S-au folosit următorii anticorpi monoclonali și parametri de lucru pentru identificarea tipurilor de celule imune la nivelul țesutului hepatic (Tabelul II).

### REZULTATE

Evidențierea așa numiților markeri serici virali hepatitici – antigene din structura virusurilor și/ sau anticorpi, care apar în urma răspunsului imun al pacientului la infecția cu virusuri hepatotrope, a reprezentat o etapă obligatorie în stabilirea diagnosticului și alcătuirea loturilor de studiu. În cazul lucrării de față s-a utilizat un panel complex de markeri virali serici (11 markeri) la toți cei 82 de pacienți.

Pe baza analizei datelor clinice, a rezultatelor markerilor virali serici și tisulari în coroborare cu examenul histopatologic cei 82 de pacienți luați în studiu au fost împărțiți în 3 grupe pe tipuri de infecții virale după cum urmează:

- 15 cazuri de infecții HBV;
- 38 infecții HCV;
- 29 infecții duble (HBV + HCV; HBV + HDV) și

triple HBV + HDV + HCV;

Au fost eliminate din studiu cele 29 de cazuri de infecții duble sau triple.

### I. Evaluarea comparativă a subpopulațiilor limfocitare T în sângele periferic la pacienți infectați cronic cu HBV și HCV.

#### 1. Analiza prin citometrie în flux a subpopulației de limfocite TH (CD3+/CD4)

În cazul limfocitelor CD4+, rezultatele fenotipării prin citometrie în flux au indicat o creștere a valorilor la 70% din pacienții infectați cu VHB, în timp ce 30% din pacienți au avut valori normale și scăzute.

În cazul infecțiilor cu VHC predomină valorile normale și ușor crescute pentru limfocitele T CD4+ la 48% și respectiv 39% din pacienți.

La lotul martor, valoarea medie a procentului limfocitelor T CD4+ a fost de 41,5, iar cea a limfocitelor T CD8+ a fost de 35,5.

Analiza statistică descriptivă în cazul subpopulațiilor CD4+ în hepatitele cronice cu VHB a relevat o distribuție simetrică uniformă a datelor cu o medie de ~ 50,4% și cu o deviație standard (SD) de 7% (ceea ce demonstrează o aglomerare a datelor în jurul mediei cu o minimă abatere standard). În cazul hepatitelor cronice cu VHC s-a constatat tot o distribuție simetrică uniformă a valorilor, cu o medie de 41,5% cu SD ~ 8%.

Raportat la media valorilor normale de 41,5% a limfocitelor T CD4+ din sângele periferic recoltat de la donatori sănătoși (lotul martor), se remarcă o tendință de creștere (~10%) a acestei subpopulații în cazul infecțiilor cronice cu VHB în timp ce la infecțiile cronice cu VHC valorile se situează în jurul normalului.

#### 2. Analiza prin citometrie în flux a subpopulației de limfocite TS/TC (CD3+/CD8+)

În cazul limfocitelor T -CD8 + s-a constatat o scădere marcată la aproximativ 80% din totalul de pacienți, indiferent de tipul infecției virale. În cazul hepatitei cronice cu virus B, 70% din pacienți au valori scăzute sub limita normală, în timp ce în hepatitele cronice cu virus C, procentul depășește 80% din cazuri. Analiza statistică descriptivă pentru populația de celule T CD8+ a evidențiat o distribuție uniformă simetrică a valorilor cu o medie de 26,4% și o SD de 2% pentru infecțiile cronice VHB, și o medie de 26,25% cu o SD de 1,6% pentru infecțiile cronice VHC.

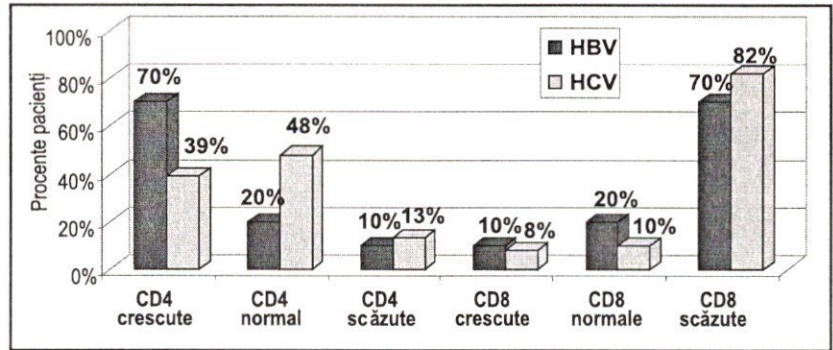
Comparativ cu media valorilor normale de 35,5% a limfocitelor T CD8+ din sângele periferic al donatorilor sănătoși (lot martor) s-a constatat o scădere a valorilor (~ 10%) pentru această subpopulație în ambele tipuri de infecții cronice virale.

Analiza comparativă pe tipuri de infecții cronice virale B și C a celulelor CD4 și CD8 din sângele periferic este

**Tabelul II** Anticorpii utilizați în fenotiparea populațiilor limfocitare tisulare

Anticorpii	Tipul	Sursa	Diluția	Specificitate - Reactivitate
UCHL1	Monoclonal	Dako	1:50	Limfocite T
CD4	Monoclonal	Neomarkers	1:50	Limfocite TH
CD8	Monoclonal	Neomarkers	1:50	Limfocite TS/C

**Graficul 1** Distribuția comparativă a celulelor CD4 și CD8 în hepatitele cronice virale în sângele periferic



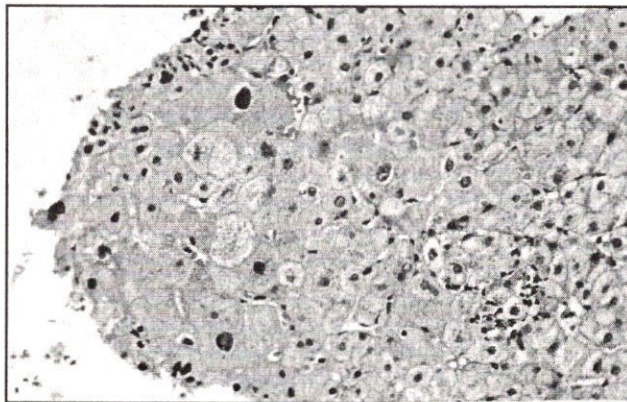
redată în graficul 1.

## II. Evaluarea comparativă a subpopulațiilor limfocitelor T în parenchimul hepatic la pacienții infectați cronic cu HBV și HCV.

Aprecierea prezenței/participării subpopulațiilor limfocitare TH (CD4+) și TS/C (CD8+) la nivel hepatic s-a bazat pe evaluarea semicantitativă a procentului de celule pozitive raportate la totalitatea limfocitelor T din infiltratul inflamator; s-a considerat pentru o prezență slabă/redușă un procent cuprins între 5-20% celule pozitive, în cazul unei prezențe moderate procentul de celule pozitive s-a situat între 20-40%, iar un procent peste 40% de pozitivitate a fost apreciat ca prezență viguroasă/intensă.

### 3. Analiza fenotipică la nivel hepatic a limfocitelor TH (CD4+):

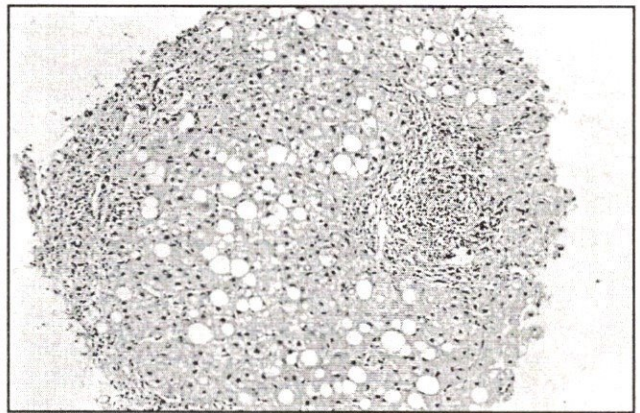
Evaluarea prezenței și distribuției subtipului de limfocite T CD4+ de la nivel hepatic a fost realizată pe baza fenotipărilor imunohistochimice ținând cont de arhitectura hepatică. Localizarea cea mai frecventă a fost la nivelul spațiului port sub formă de aglomerări și mai rar intralobular cu aspect dispersat. În hepatitele cronice cu VHB (Fig. 1), 90% din cazurile studiate au prezentat reacție IHC pentru CD4 într-un procent variabil de limfocite cuprins între 5%-20% (medie de 12,5%) din infiltratul inflamator portal (Fig. 3)



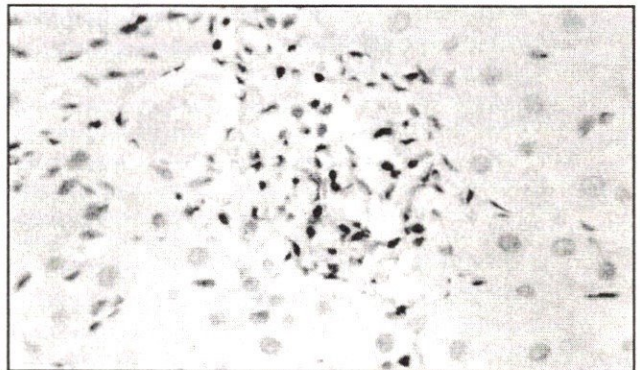
**Fig.1** Aspecte histopatologice într-o biopsie hepatică la un pacient cu hepatită cronică B, HE, 10x

Fenotiparea limfocitelor T CD4+ la nivelul parenchimului hepatic în cazul infecțiilor cronice cu VHC (Fig. 2) a evidențiat un procent de celule pozitive cuprins între 10 și 50% (medie de 30%) din celulele infiltratului inflamator.

Peste 40% dintre pacienții cu hepatită cronică C studiați au avut valori crescute pentru subpopulația de limfocite T CD4+ (Fig. 4)



**Fig. 2** Aspecte histopatologice într-o puncție biopsie hepatică la un pacient cu hepatită cronică C, HE, 10x

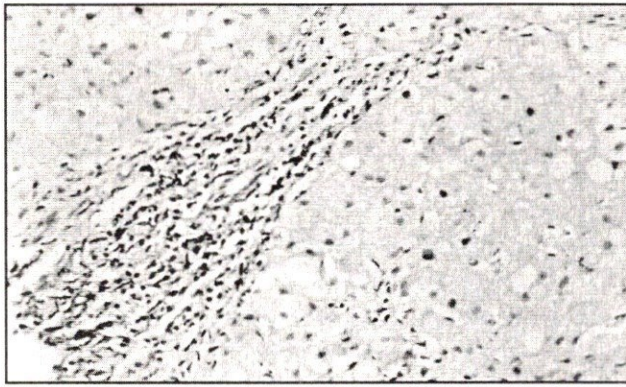


**Fig.3** Reacție IHC pozitivă în rare celule CD4+ într-o hepatită cronică B, IHC, 40x

Comparativ cu infecțiile cronice cu VHB se constată un număr mai mare al limfocitelor T CD4+ la nivel hepatic în cazul infecțiilor cu VHC. (Graficul 2).

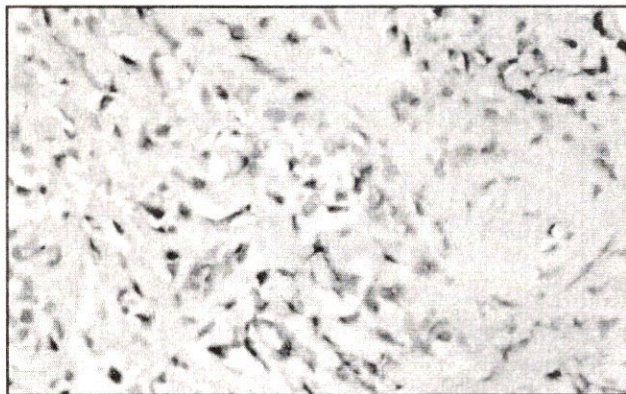
### 4. Analiza fenotipică la nivel hepatic a limfocitelor TS/TC (CD8+):

Analiza participării și repartiției subpopulației de limfocite T CD8+ la nivel hepatic s-a realizat pe baza fenotipării IHC. Distribuția limfocitelor CD8+ pozitive a fost observată intralobular sub formă de mici aglomerări și la nivel portal în infiltratul inflamator.



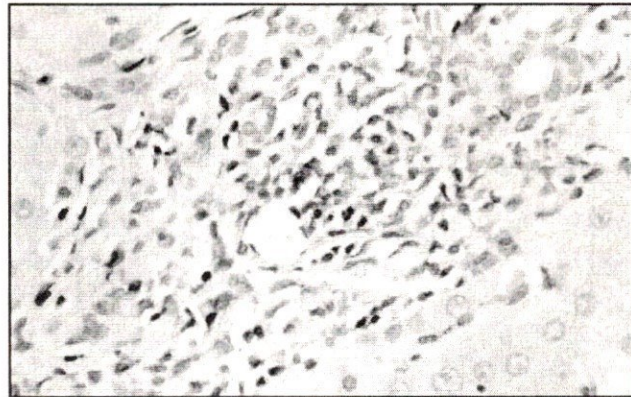
**Fig. 4** *Reacție IHC pozitivă în frecvente celule CD4+ într-o hepatită cronică C, IHC, 20x*

În cazul hepatitelor cronice cu VHB la 50% din pacienții studiați limfocitele T CD8+ au prezentat un procent crescut (viguros) de pozitivitate (peste 40% din celulele infiltratului inflamator), în restul cazurilor participarea limfocitelor T CD8+ a fost slabă. (Fig.5) În infecțiile cronice cu VHC, ~ 80 %,din cazuri au prezentat un procent scăzut de pozitivitate al limfocitelor T CD8 + ce nu a depășit 5-15% din celulele infiltratului inflamator. (Fig.6).



**Fig.5** *Reacție IHC pozitivă în relativ frecvente celule CD8+ într-o hepatită cronică B, IHC, 40x*

Analiza comparativă a proporției de limfocite T CD4+/CD8+ este prezentată în graficul 2.



**Fig.6** *Reacție IHC pozitivă în rare celule CD8+ într-o hepatită cronică C, IHC, 40x*

În cazul hepatitelor cronice cu VHB analiza statistică comparativă între populațiile CD4+ și CD8+ la nivel hepatic a demonstrat o relație invers proporțională ( $r = - 0.7$ ) semnificativă statistic ( $p = 0.05$ ), creșterea populației CD4+ însoțindu-se de scăderea populației CD8+ (Graficul 3).

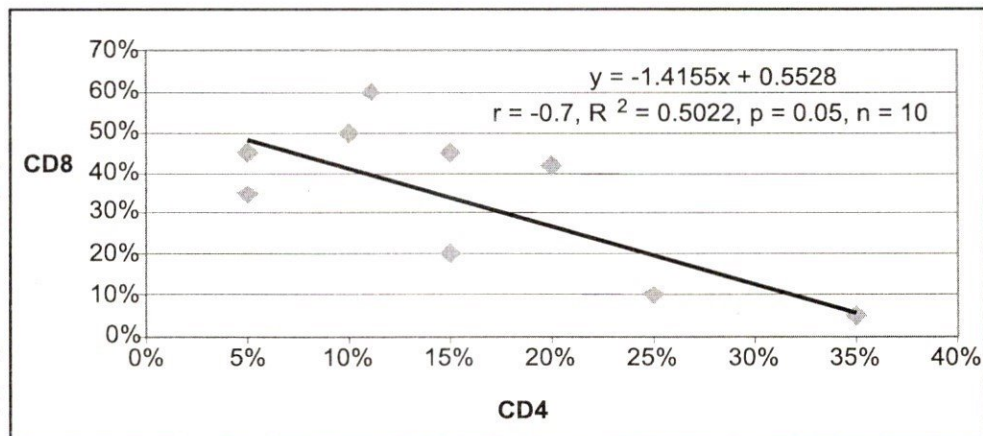
În infecțiile cu VHC nu s-a constatat nici o corelație la nivel hepatic între cele 2 subpopulații limfocitare, acestea fiind independente.

## DISCUȚII

Numeroase lucrări referitoare la procesul de cronicizare în cazul infecțiilor cu VHB și VHC aduc în discuție o serie de factori favorizanți care contribuie la persistența virusurilor infectante. Alături de factorii virali ( cinetica virală, genotip, mutații virale etc) competența sistemului imun al gazdei pare să joace un rol cheie în modul de evoluție al bolii. Factorii care influențează apărarea imună a gazdei în infecțiile cu virusuri hepatotrope se referă la: capacitatea expansiunii răspunsului limfocitelor T, răspunsul slab al celulelor T CD4+ și T CD8+ față de antigenele virale, alterarea balanței Th1/Th2, secreția insuficientă de citokine, inhibarea procesării/ prezentării antigenului viral, inactivarea epitopilor CTL, conversia mutațională a epitopilor CTL pentru transformarea în CTL antagoniste, etc.[2;5;12;24;40]

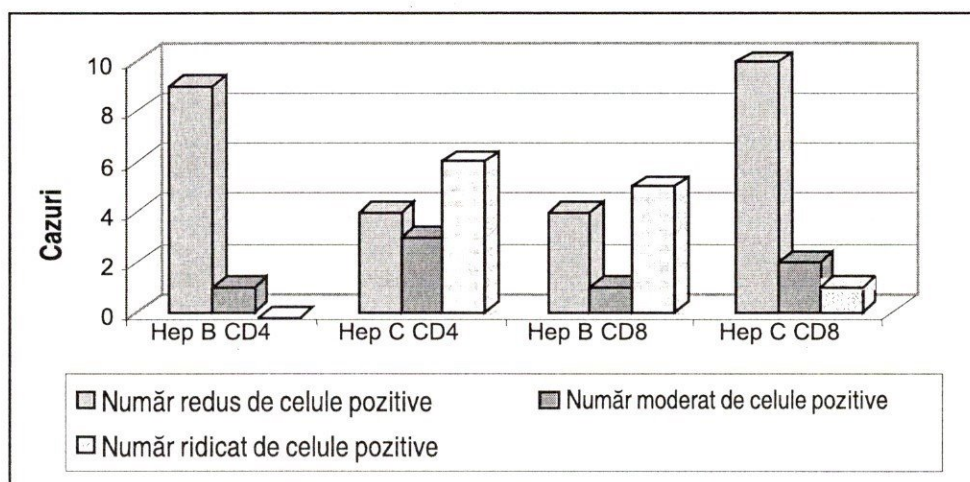
S-a constatat că un răspuns viguros specific antiviral al celulelor CD4+ se asociază cu controlul eficient al virusurilor hepatitice care are ca efect vindecarea pacientului. În cazul pacienților la care s-a instalat infecția cronică cu VHB/VHC,

**Graficul 2**  
*Corelația între subpopulațiile CD4 și CD8 din parenchimul hepatic în hepatitele cronice cu VHB*



Graficul 2

**Proportia  
de celule CD4  
/ CD8 din  
parenchimul  
hepatic în  
hepatitele  
cronice virale**



s-a constatat, în faza acută, un răspuns imun celular slab calitativ și cantitativ, atât pentru celule T CD4+ cât și pentru celulele CD8+, care s-a constatat că se păstrează pe o perioadă îndelungată. [3;6;9;19;34]

Se consideră că un astfel de răspuns slab/inadecvat al sistemului imun este inefficient, întrucât poate controla numai parțial infecția virală, permițând instalarea unui mediu inflamator prelungit care determină leziuni la nivel hepatic. Dezechilibrul balanței virus-răspuns imun, nu permite clearance-ul viral, dar poate permite perpetuarea leziunilor cronice hepatice. Mecanisme de evitare sau inhibare ale sistemului imun, împiedică "recunoașterea celulelor infectate" datorită unei "anihilări parțiale" ale antigenelor virale și/sau asociate virusului, facilitează creșterea viremiei, apariția mutațiilor virale, precum și selectarea unor fenotipuri virale mai agresive.[12]

În studiului nostru, analiza celulelor CD4+ din sângele periferic a evidențiat, la pacienții cu hepatită cronică B, creșterea valorilor peste normal la 70% din cazuri, rezultat care nu concordă în totalitate cu majoritatea informațiilor din literatură. Interesant este faptul că aceștia prezentau în ser AchBc IgM care ar putea să sugereze o recrudescență a bolii (existența unui episod acut), datorat eventual apariției unor mutații virale sau a altor factori care să determine un răspuns cantitativ mai viguros al limfocitelor CD4+. Pe de altă parte evaluarea la nivelul parenchimului hepatic a subpopulației de limfocite CD4+ pe același lot de pacienți a demonstrat o participare slabă/ redusă la 90% din cazurile luate în studiu, rezultat concordant cu datele din literatură. În acest sens sunt semnalate fenomene de reducere/slăbire până la dispariție ale răspunsului imun antiviral specific al celulelor CD4+, însoțit de încetarea secreției de de INF- pentru unele clone. Aceste aspecte corespund unei transformări fenotipice ale acestor limfocite posibil determinate de mutațiile din zona epitopului pentru celulele TH.[8]

Rezultatele noastre privind analiza subpopulației de limfocite CD4+ în sângele periferic la pacienții cu hepatită cronică C au evidențiat valori normale sau ușor crescute la 48% și respectiv 39% din cazuri. În compartimentul parenchimului hepatic participarea celulelor CD4+ a fost slabă la 60% din cazuri, asemănătoare cu cea observată în cazul infecțiilor cronice cu VHB. Această participare redusă s-ar putea datora faptului că unele proteine ( NS4, core) din componența VHC, au un efect supresor asupra răspunsului imun prin stimularea IL-10 și inhibarea IL-12 de la nivelul monocitelor. Acest fenomen induce la rândul său inhibarea

celulelor dendritice care joacă un rol determinant în controlul diferențierii celulelor TH (Th1).[2;15]

Studii recente privind statusul funcțional al celulelor TH în hepatitele cronice virale B și C, au semnalat reducerea secreției unor citokine de tip Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) cu rol esențial în eliminarea virusului. Experimental, s-a dovedit că este posibilă reechilibrarea balanței Th1/Th2 și redarea statusului funcțional viguros al celulelor CD4+ cu inducerea secreției citokinelor de tip Th1 și creșterea funcției proliferative a răspunsului imun, prin administrarea experimentală a IL-12 și IL-18.[21;32;33]

Un rezultat interesant al studiului nostru îl reprezintă răspunsul viguros la nivel hepatic al celulelor TH-CD4+ prezent la 40% din pacienții cu infecție cronică C. Acest fenomen de creștere uneori până la dublare a populației de celule CD4+ a fost semnalat de unii autori în hepatitele cu VHC în cazul unui răspuns imun față de epitopi multipli, dar și în cazul transplantului hepatic în fazele timpurii, fără însă a se putea face o corelație cu evoluția.[28;29]

Acest dezechilibru calitativ și cantitativ al celulelor TH se asociază cu răspunsul antiviral inefficient al limfocitelor CD4+ și la nivelul parenchimului hepatic, în zonele infiltratului inflamator, ducând pe de o parte la eșecul eliminării virusului, iar pe de altă parte la progresia leziunilor hepatice.[5]

A doua categorie de subpopulații limfocitare analizate de noi au fost limfocitele T S/C - (CD8+) celule care joacă un rol critic în apărarea antivirală, intervenind în răspunsul imun intrahepatic destul de timpuriu. Rolul protector al acestor celule a fost demonstrat pe cimpanzeii infectați cu VHC la care inducerea unei scăderi marcate a limfocitelor T CD8+ a determinat o creștere semnificativă a încărcării virale, chiar și în prezența unui răspuns imun al celulelor T CD4+. Reducerea viremiei s-a realizat numai după refacerea populației de celule T CD8+.[25]

Limfocitele T S/C - CD8+ virus-specifice sunt capabile să recunoască și să elimine hepatocitele infectate cu virusuri hepatice (potențial și alte tipuri celulare), teoretic înainte de eliberarea virionului, iar prin secreția de citokine antivirale pot proteja celulele din jur. Privitor la impactul diferitelor subseturi de limfocite T CD8+, există diferite opinii privind rolul benefic - în apărarea antivirală, dar și rolul negativ - în inducerea reacțiilor imunopatologice.[35] Studiile realizate pe diferitele subseturi de limfocite T CD8+, au permis atribuirea unor posibile funcții acestor celule în cadrul răspunsului imun antiviral. Una dintre funcții se referă la controlul replicării virale, care poate fi realizat chiar și în absența unui infiltrat

inflamator intrahepatic de către celulele activate T CD8+ virus specifice. Date din literatură semnalează că prin medierea unor citokine, celulele T CD8+ pot inhiba replicarea ARN-ului VHC prin efect citotoxic direct.[20;16]

O altă funcție atribuită limfocitelor T CD8+ non-antigen specifice prezente în infiltratul inflamator ar putea fi inducerea de reacții imunopatologice, prin implicarea lor directă sau indirectă la recrutarea celulelor T, extinderea leziunilor necroinflamatorii și fibrozei de la nivel hepatic. Există studii care susțin faptul că secreția de INF- $\gamma$  de către limfocitele intrahepatice T CD8+ determină un "homing" abundent de celule non-antigen specifice în ficat. În absența eliminării virusului, aceste celule secretă chemokine care amplifică recrutarea celulelor T citotoxice non-specifice ducând la accentuarea gradului necroinflamației.[1]

Este cunoscut faptul că în infecțiile cronice cu virusuri hepatice, apare un declin al răspunsului imun adaptativ cu scăderea numărului de celule T CD8+ în sângele periferic și intrahepatic și o producție scăzută de anticorpi specifici.[3;14;24]

Rezultatele noastre concordă cu datele din literatură, privind analiza cantitativă a populației de limfocite CD8+ din sângele periferic, evidențiind o scădere marcată față de valorile normale atât în cazul hepatitelor cronice cu VHB (70% pacienți) cât și în cazul hepatitelor cronice cu VHC (80% din pacienți). Declinul populației de celule CD8+ a fost descris și de alți autori în corelație cu creșterea fenomenului de apoptoză sau legat de reducerea secreției unor citokine.[35;16]

Funcția defectivă persistentă a limfocitelor T CD8+ în hepatitele cronice cu VHC pare să fie menținută de expunerea prelungită la Ag. virale, de imunosupresia unor gene virale și de diminuarea unor funcții accesorii ale celulelor dendritice.[37]

Aceste fenomene pot explica prezența în număr redus a subpopulației de limfocite T S/C - CD8+ la nivelul parenchimului hepatic mai ales în cazul hepatitei cronice cu VHC, rezultat obținut și în studiul nostru. În cazul infecțiilor cronice cu VHB am constatat o participare redusă a acestor limfocite numai la 50% din pacienții luați în studiu. La restul pacienților s-a constatat o prezență relativ viguroasă a limfocitelor CD8+. Mai mult, analiza comparativă a limfocitelor T CD4+ și T CD8+ la nivelul parenchimului hepatic, în cazul infecțiilor cu VHB a evidențiat o relație inversă între cele două subpopulații. Există studii realizate pe pacienți infectați cronic cu HBV, la care răspunsul imun specific anti VHB, prea slab pentru eliminarea virusului, poate fi însă suficient de puternic pentru distrugerea hepatocitelor infectate, întreținând în acest fel inflamația cronică persistentă. [27] Aceste aspecte ar putea fi explicate pe baza unor observații care susțin că expunerea cronică la antigenele VHB induce celulelor T CD8+ o alterare a funcțiilor specifice printr-o adresabilitate față de unii epitopi subdominanți. În acest fel celulele T CD8+ pot evita parțial deleția chiar în cazul persistenței unei cantități mari de Ag virale, dar ele nu mai pot exercita o acțiune selectivă asupra celulelor infectate din parenchimul hepatic, sugerând anergismul lor in vivo.[26]

Studii recente asupra răspunsului imun cantitativ și calitativ al limfocitelor T CD4+ și T CD8+ în cazul pacienților infectați cronic cu VHB și VHC au identificat în ambele subpopulații, două tipuri de celule T de memorie: unele "efectorii imediate" care se localizează în țesuturi și altele "centrale - de viață lungă" care recirculă în organism. Ultimele tip de limfocite T este considerat mult mai eficient în apărarea antivirală datorită capacității de proliferare rapidă

în cazul reexpunerii la antigene virale. Stimularea antigenică virală cronică, prezentă în infecțiile persistente, pare să inhibe tranziția limfocitelor de memorie T CD8+ "efectorii" în celule T de memorie "centrale - de viață lungă" - permițând apariția hepatitelor cronice virale.

În acest context, obținerea unui vaccin cu o eficiență mult mai mare ar trebui să poată induce persistența/creșterea celulelor centrale de memorie cu „viață lungă” atât în subpopulația T CD8+ cât și în subpopulația T CD4+.[28;23;31;39]

Aprofundarea cercetărilor privind implicarea subpopulațiilor limfocitare T în corelație cu mecanismele care conduc la un răspuns imun cantitativ și calitativ adecvat, vor sta la baza promovării unei noi strategii de vaccinare în cazul infecțiilor cu virusuri hepatice. Vaccinurile preconizate vor fi de tip profilactic, pe baza inducerii memoriei imune și de tip „terapeutic” pe baza creșterii unui răspuns imun celular controlat, în timpul infecțiilor cronice.[4]

În concluzie, pe cazurile studiate de noi, s-a observat existența unor diferențe ale răspunsului imun celular, privind cinetica și participarea subpopulațiilor de celule TH-CD4+ și T S/C-CD8+ în funcție de tipul virusului hepatic infectant. În cazul hepatitelor cronice cu VHB, cinetica răspunsului imun celular pare să fie mai rapidă și mai intensă, în cazul limfocitelor CD4+ din sângele periferic determinând probabil și unele modificări cantitative la nivelul parenchimului hepatic pentru ambele subpopulații, intrahepatic apărând o relație inversă între TH-C D4+ și T S/C-CD8+. Spre deosebire de hepatita cronică cu VHB, în cazul pacienților cu hepatită cronică cu VHC, se constată o latență a celulelor CD4+ atât în sângele periferic cât și în parenchimul hepatic. Subpopulația de limfocite TCD8+ este semnificativ depresată în ambele compartimente, circulant și intrahepatic, sugerând o cinetică a răspunsului imun celular lentă/defectuoasă.

## BIBLIOGRAFIE

1. **Agrati C., Nisii C., Olova A., D'Offizi G., Montesano C., Pucillo L P., Poccia F.** Lymphocyte distribution and intrahepatic compartmentalization during HCV infection: a main role for MHC-unrestricted T cells. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2002, 50, 307-316
2. **Brady M.T., MacDonald A.J., Rowan A.G., Mills K.H.** Hepatitis C virus non-structural protein response suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes. Eur. J Immunol. 2003, 33, 3448-3457
3. **Bertoletti A. and Ferrari C.** Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. Hepatology. 2003, 38, 4-13
4. **Berzofsky J.A., Jeffrey D.A., Janik J., Morris J., Kon Oh. S., Terabe M., Beyakov I.** Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. J. Clin. Investigation 2004, 114, 450-460
5. **Cecere A., Marotta F., Vangieri B., Tancredi L., Gattoni A.** Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response to different cytokine profile. Panminerva Med. 2004, 46, 171-187
6. **Chang K-M, et al.** Differential CD4+ and CD8+ T-cells responsiveness in hepatitis C virus infection. Hepatology 2001, 33, 267-276
7. **Chisari F.V.** Viruses, immunity and cancer: Lessons from Hepatitis B, Am. J. of Pathology. 2000, 154 1118 - 1132

8. **Ciurea A., Hunziker L., Klenerman P., Hengartner H., Yinkernagel R.M.** Impairment of CD4+ T cell responses during chronic virus infection prevents neutralizing antibody responses against virus escape mutants. *J.Exp.Med.* 2001, 193, 297-305
9. **Day CL et al.** Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J.Virol.* 2002, 76, 1284-12595
10. **Gerlach, J.T., et al.** Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology.* 1999, 117: 933-941
11. **Grakoui, A., et al.** HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science.* 2003, 302, 659-662
12. **Gremion C. and Cereny A.** Hepatitis C virus and immune system: a concise review. *Rev.Med.Virol.* 2005, 15, 235-236
13. **Guidotti L.G. and Chisari F.V.** Cytokine - mediated control of viral infections, *Virology.* 2000, 273, 221-227.
14. **He X-S., et al.** Quantative analysis of hepatitis c virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999, 96, 5692-5697
15. **Janvier G., Chaix M.L., Fontaine H., Bresson J.L., Pol S., Riviere Y.,** The core-specific precursor T cell response is directed to the N-terminal and central parts of the protein and positively correlates to the viral load in chronically HCV-infected patients. *Virology.* 2005, 340, 318-325
16. **Kasahara S., et al.,** Lack of Tumor Necrosis Factor Alpha induces proliferation of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J.Virol.* 2003, 77, 2469-2474
17. **Klenerman P., Lucas M., Barnes E., Harcourt G.** Immunity to hepatitis C virus : stuned but not defeated., *Microbes and Infection.* 2002, 4, 57-65
18. **Lauer G.M. and Walker BD.,** Hepatitis virus infections. *N.Engl.J.Med.* 2001, 345, 41-52
19. **Lechner F., et al .** Analysis of successful immune response in person infected with hepatitis C virus. *J.Exp. Med.* 2000, 191, 1499-1512
20. **Liu.C., Zhu H., Tu Z., Xu.Y-L., Nelson D.R.** CD8+ interaction with HCV replicon cells: evidence for both cytokine- and cell-mediated antiviral activity. *Hepatology* 2003, 37, 1335-42.
21. **Lohr H.F., Pingel S., Bocher W.O., Benhard H., Herzog-Hauff S., Rose-John S.** Reduced virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells in patients with chronic hepatitis B-restoration by exogenous interleukin-12. 2002, 130, 107-114.
22. **Lok A.S., McMahon BJ.,** Chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2001, 34 1225-1241;
23. **Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrancois, L.** Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001, 291, 2413-2417.
24. **Main M.K., Boni C., Larrubia J.R., Regnar S., Ogg G.S.** The role of virus-specific CD8+ cells in viral control and liver damage during persistent hepatitis B virus infection. *J.Exp. Med.* 2000, 6, 578-582
25. **Nascimbeni M., et al.** Kinetics of CD4+ and CD8+ memorz T-cell responses during hepatitis C virus rechallengence of previously recovered chimpanzees. *J. Virol.* 2003, 77, 4781- 4793.;
26. **Reigner S., et al.** Escaping high viral load exhaustion: CD8+ cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J.Exp. Med.* 2002, 195, 1089-1101.
27. **Rehermann B and Chrisari F.V.** Intrahepatic T cell in Hepatitis B : Viral controls versus liver cell injury, *J. Exp. Med.* 2000, 191, 1263- 1268.
28. **Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A..** Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999, 401, 708-712
29. **Schirren A.C., et al.** Liver-derived hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cells in HCV infection. *Imunol. Rev.* 2000, 174, 90-97
30. **Schirren A.C., et al.** Hepatitis C, D, virus-specific, T cell response after liver transplant. *J. Infect. Dis.* 2001, 183, 1187-1194
31. **Seder, R.A., and Ahmed, R.** Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and Mmemory T cell generation. *Nat. Immunol.* 2003, 4, 835-842
32. **Semmo N., Day C.L., Ward S.M., Lucas M., Harcourt G., Loughry A., Klenerman P.** Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology.* 2005, 41, 1019-1028
33. **Szkaradkiewicz A., Jopec A., Wysocki J.** Effects of IL-12 and IL-18 on HBcAg-specific cytokine production by CD4+ lymphocytes of children with chronic hepatitis B infection. *Antiviral Rev.* 2005, 66, 23-27
34. **Takaki A., et al.** Cellular immune responses persist and humoral respons decrease tow decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat.Med.* 2000, 6, 578-582
35. **Thimme, R., et al.** Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.* 2001, 194, 1395-1406
36. **Toubi E et al.** Enhanced peripheral T-cell apoptosis in chronic hepatitis C virus infection: association with liver disease severity. *Journal of Hepatology.* 2001, 35, 774-780
37. **Zajac A., Blattman J., Murali-Kishna J., Sourdive K., Suresh M., Altman J., Ahmed R.,** Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector functions. *J.Exp. Med.* 1998, 188, 2205-2222
38. **Wedmeyer H., et al.** Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Immunol.* 2002, 169, 3447-3458
39. **Wherry, E.J., et al.** Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* 2003, 4, 225-234
40. **Webster G.J.M., and Berttoletti A.** Control or persistence of hepatitis B virus: The crical role of initial host-virus interaction. *Immunology and Cell Biology.* 2002, 80, 101-109