

## Показатели цитокиновой регуляции у больных хроническим гепатитом С с различными спектром антител к вирусу гепатита С и морфологическими изменениями

Е. Л. Красавцев, В. М. Мицура, С. В. Жаворонок

Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь

## Parameters of Cytokine Regulation in Patients With Chronic Hepatitis C Who Have Different Antibodies Spectrum to Hepatitis C Virus and Various Morphological Changes

E. L. Krasavtsev, V. M. Mitsura, S. V. Zhavoronok

Gomel State Medical University, Belarus

### Аннотация

Проведено сравнение уровней цитокинов: фактор некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ), ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4 в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С (ХГС) с различными спектром антител и морфологическими изменениями. У больных ХГС отмечается увеличение уровня исследованных цитокинов сыворотки при сравнении с донорами (достоверно при исследовании ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ ). Установлено достоверное ( $p=0,017133$ ) повышение уровня ИЛ-1 $\beta$  у пациентов с ХГС с наличием анти NS5 при сравнении с пациентами у которых эти антитела не определялись. Содержание исследованных цитокинов возрастало с увеличением гистологической активности. Уровень ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке у больных с умеренной активностью ХГС был достоверно выше ( $p=0,014$ ), чем у больных с минимальной активностью. У больных с признаками склероза в биооптате печени уровни исследованных цитокинов в сыворотке также были выше, чем у доноров. Достоверные отличия от доноров отмечались у пациентов с различной степенью склероза при определении ИЛ-1 $\beta$  и у больных с тяжелой степенью склероза также и при исследовании уровней ИЛ-2 и ФНО- $\alpha$ . Достоверно выше были уровни ИЛ-1 $\beta$  ( $p=0,04636$ ) и ИЛ-4 ( $p=0,04540$ ) у больных с умеренным склерозом при сравнении с пациентами со слабым склерозом.

Изменение уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных ХГС может иметь важное диагностическое и прогностическое значение и требует дальнейшего изучения.

### Ключевые слова

Хронический гепатит С, цитокины, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, антитела, морфологические изменения.

Вирус гепатита С (HCV) оказывает прямое цитопатическое действие, вызывающее цитолиз и клиренс инфицированных гепатоцитов. Это способствует активации клеток макрофагально-фагоцитарной и Т-эффекторной систем иммунитета. Т-лимфоциты-хелперы (Тх) играют существенную роль в регуляции иммунного ответа. Тх

### Summary

The analysis of serum cytokine levels: tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukins (IL) -1 $\beta$ , IL-2 and IL-4 in patients with chronic hepatitis C (CHC) who have different antibodies spectrum to hepatitis C virus (HCV) and various morphological changes was performed. The cytokine levels were higher in patients with CHC in comparison with healthy blood donors (significantly for IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ). In CHC patients with the presence of antibodies to NS5 protein of HCV the IL-1 $\beta$  levels were higher than in those without ( $p=0.017$ ). The studied cytokines levels increased in persons with augmentation of histological activity. The IL-1 $\beta$  levels were significantly higher in patients with moderate activity than in those with slight activity ( $p=0.014$ ). In patients with hepatic fibrosis the serum cytokines levels were higher than in healthy blood donors (significantly for IL-1 $\beta$ , in patients with severe fibrosis — also for IL-2 and TNF- $\alpha$ ). The levels of IL-1 $\beta$  and IL-4 were significantly higher in CHC patients with moderate fibrosis vs. in those with slight fibrosis.

The variations of pro-inflammatory and contra-inflammatory serum cytokines levels in patients with CHC might have importance for diagnosis and prognosis and require the further study.

### Keywords

Chronic hepatitis C, cytokines, TNF- $\alpha$ , IL -1 $\beta$ , IL-2, IL-4, antibodies, morphological changes.

клетки дифференцируются на 2 группы, разделяемые в зависимости от профиля вырабатываемых ими цитокинов: Тх1 и Тх2. Тх1 стимулируют Т-клеточный ответ и цитотоксичность Т лимфоцитов и вырабатывают интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), интерлейкин-2 (ИЛ-2), фактор некроза опухоли (ФНО- $\alpha$ ) и др. Тх2 стимулируют гуморальное

звенно иммунитета и вырабатывают ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и др. [1,2]. Нарушение баланса продукции цитокинов Тх1/Тх2 клетками имеет большое значение в патогенезе хронизации и прогрессирования HCV-инфекции. Иммуный ответ по Тх1 типу способствует элиминации вируса, а по Тх2 типу — персистенции инфекции [3,4,5]. По функциональной активности цитокины разделяют на провоспалительные (ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ) и противовоспалительные (ИЛ-4, ИЛ-10) [1,2].

Фактор некроза опухоли —  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) активирует Т- и В- лимфоциты, естественные клетки-киллеры, опосредует гепатотоксический эффект, принимает участие в апоптозе поврежденных (в том числе вирусом) клеток. Повышение уровня ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови характеризует процессы воспаления и элиминации клеток путем прямой цитотоксичности или апоптоза. При ряде воспалительных и аутоиммунных заболеваний уровень ФНО- $\alpha$  отражает тяжесть патологического процесса [1,6].

ИЛ-1 $\beta$  продуцируется мононуклеарами периферической крови. Повышение ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови сопутствует целому ряду заболеваний воспалительного и аутоиммунного характера [1,6]. ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  способны активировать звездчатые клетки печени, играющие ключевую роль в фиброгенезе печени [7]. Кроме того, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  способствуют развитию жировой инфильтрации печени и могут подавлять регенерацию печеночной ткани [5].

ИЛ-2 — регуляторный цитокин, способный компенсировать проявления иммунной недостаточности, восстанавливать баланс Тх1 и Тх2 — лимфоцитов, что ведет к регуляции продукции противо- и провоспалительных цитокинов. Снижение индуцированной продукции ИЛ-2 является одной из характеристик Т-клеточного иммунодефицита. Дефицит продукции ИЛ-2 часто определяется при ХГС [8,9,10]. Повышение уровня ИЛ-4 в сыворотке крови сопровождается системным Тх2-ответом, что встречается при аллергических реакциях [6] и при хронических вирусных инфекциях [1].

Цитокины крови инактивируются в печени. Нарушение этой инактивации при болезнях печени может служить причиной иммунных нарушений [5].

Геном вируса гепатита С (HCV) кодирует структурные (С, Е1, Е2) и неструктурные (NS2, NS3, NS4, NS5) белки. К структурным белкам относятся: сердцевидный (core-protein) и два гликопротеина оболочки (Е1, Е2 — envelope proteins). К неструктурным — ферменты, играющие роль в репликации вируса (в частности, NS3 — протеаза/геликаза, NS5 — РНК-полимераза). К каждому из этих белков вырабатываются антитела, циркулирующие в крови [11].

В крови больных хроническим гепатитом С (ХГС) закономерно обнаруживаются антитела к core- белку и неструктурным протеинам. Чаще всего при ХГС выявляются антитела к NS4 (anti-NS4) [11,12]. Известно, что антитела к неструктурным белкам HCV и анти-HCV IgM обнаруживаются гораздо реже у больных ХГС в стадии ремиссии, чем при повышенной активности ХГС [11,13]. Считается, что обнаружение anti-HCV IgM может отражать уровень виремии и активность ХГС [14,15]. Исчез-

новение антител к core белку, NS4 и NS5 в динамике может являться признаком, указывающим на формирование клинико-биохимической ремиссии [13]. Антитела к NS5 и анти-HCV IgM могут считаться дополнительными маркерами вирусной репликации и активности процесса в динамике этиотропной терапии. Имеется мнение, что титры антител к NS5 могут отражать эффективность терапии  $\alpha$ -ИФН, причем их повышенные значения характерны для лиц, не отвечающих на терапию  $\alpha$ -ИФН [16]. Выявлена зависимость ответа на интерферонотерапию от уровня антител класса IgM (у ответивших на терапию титры антител до лечения и в его процессе были ниже) [15].

Целью исследования было изучение содержания некоторых цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4) в сыворотке крови у больных ХГС с различными спектром антител к вирусу гепатита С и морфологическими изменениями.

#### Материалы и методы

Исследовалось содержание цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4 в сыворотках крови больных хроническим гепатитом С. Диагноз у всех больных был подтвержден обнаружением антител к HCV (анти-HCV) методом иммуноферментного анализа и РНК HCV методом полимеразной цепной реакции. Всего из 85 обследованных сывороток в 82 образцах (96,5%) были выявлены антитела к core-протеину (анти-core), в 84 образцах (98,8%) — антитела к NS3 (анти-NS3), в 81 образцах (95,3%) — антитела к NS4 (анти-NS4), в 48 образцах (56,5%) — антитела к NS5 (анти-NS5). Анти-HCV IgM выявлялись у 48 больных (56,5%).

42 больным проводилась прижизненная биопсия печени с последующим определением гистологического индекса степени активности (ГИСА) и гистологического индекса стадии хронизации (ГИСХ) [17]. По результатам морфологического исследования у 30 пациентов была минимальная гистологическая активность и у 12 умеренная, у 5 больных ХГС признаков склероза не было обнаружено, у 27 он был слабым, у 7- умеренным, у 2 — тяжёлым и одного выявлялся цирроз.

Изучение цитокинов проводилось с использованием иммуноферментных тест-систем, производимых фирмой «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург).

В качестве контроля использовались 10 образцов сыворотки доноров, постоянно проживающих в Гомеле и Гомельской области и не имеющих хронических заболеваний и маркеров инфицирования вирусами парентеральных вирусных гепатитов.

Статистический анализ полученных данных проводился на персональном компьютере с помощью программы STATISTICA v.5.5. Учитывая отсутствие нормального распределения уровней цитокинов, при статистическом анализе был использован непараметрический критерий Манна-Уитни.

#### Результаты и их обсуждение

Результаты исследования у больных ХГС в зависимости от выявления (антиHCV IgM +) или отсутствия (антиHCV IgM -) антиHCV IgM представлены в табли-

це 1 (указано здесь и далее среднее значение концентрации цитокинов в пг/мл). У пациентов ХГС как с обнаруженными антиНСV IgM, так и с их отсутствием уровни ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  были выше, чем у доноров, но достоверность была лишь при исследовании ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ . Необходимо отметить, что содержание ИЛ-4, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  было выше у больных с отсутствием антиНСV IgM (отличия недостоверны,  $p > 0,05$ ).

Уровни цитокинов в сыворотке при ХГС у больных с обнаруженными (антиNS5 HCV+) и без (антиNS5 HCV-) антиNS5 представлены в таблице 2. Также содержание всех исследованных цитокинов в этих группах было выше, чем у доноров (достоверно для ИЛ-1 $\beta$  в обеих группах и ФНО- $\alpha$  у пациентов с отсутствием антиNS5).

У пациентов с выявленными антиNS5 уровень ИЛ-1 $\beta$  был достоверно ( $p=0,017133$ ) выше, чем у больных ХГС, у которых эти антитела не регистрировались.

Результаты определения уровня цитокинов сыворотки в зависимости от гистологической активности представлены в таблице 3. Следует отметить, что уровни всех исследованных цитокинов сыворотки были выше у больных ХГС с различным уровнем гистологической активности, чем у доноров, но достоверность была лишь при исследовании ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , и возрастали с увеличением активности. Также необходимо отметить, что уровень ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке у больных с умеренной активностью

ХГС был достоверно выше ( $p=0,014$ ), чем у больных с минимальной активностью. Повышение уровня ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  свидетельствует об активном воспалении печеночной ткани у больных ХГС и об его увеличении с возрастом гистологической активности.

Результаты определения уровня цитокинов сыворотки в зависимости от степени склероза представлены в таблице 4. У больных с признаками склероза в биоптате печени уровни исследованных цитокинов в сыворотке также были выше, чем у доноров. Достоверные отличия от доноров отмечались у пациентов с различной степенью склероза при определении ИЛ-1 $\beta$  и у больных с тяжелой степенью склероза также и при исследовании уровней ИЛ-2 и ФНО- $\alpha$ . Статистический анализ не проводился при сравнении уровней исследованных цитокинов у больного с циррозом печени в связи с тем, что это было единичное наблюдение. Также достоверные отличия были получены при сравнении уровня ИЛ-1 $\beta$  ( $p=0,04636$ ) и ИЛ-4 ( $p=0,04540$ ) у больных со слабым и умеренным склерозом. Уровни ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-4 у пациентов с умеренным склерозом были выше.

Повышение уровня ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  свидетельствует об активации звездчатых клеток печени, играющих ключевую роль в фиброгенезе печени. Возрастание уровня ИЛ-2 у больных с тяжелым фиброзом и ИЛ-4 у пациентов с умеренным фиброзом может указывать на развитие аутоиммунных и аллергических реакций при прогрессировании степени склероза в ткани печени.

**Таблица 1**

**Уровни цитокинов в сыворотке при ХГС в зависимости от выявления антиНСV Ig M**

Цитокин	доноры n=10	Больные ХГС с антиНСV IgM + n=43	Больные ХГС с антиНСV IgM — n=35
ИЛ-2, пг/мл	20,86	54,9	50,2
ИЛ-4, пг/мл	34,62	71,3	116,5
ИЛ-1 $\beta$ , пг/мл 13,93		431,9 $p=0,000077$	509,0 $p=0,00007$
ФНО- $\alpha$ , пг/мл	28,25	102,6 $p=0,032546$	151,1 $p=0,046273$

Примечание: достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами доноров и больных ХГС с антиНСV IgM+ и антиНСV IgM — отмечены уровнем  $p$ .

**Таблица 2**

**Уровни цитокинов в сыворотке при ХГС в зависимости от выявления антиNS5 HCV**

Цитокин	доноры n=10	Больные ХГС с антиNS5 HCV + n=42	Больные ХГС с антиNS5 HCV — n=35
ИЛ-2, пг/мл	20,86	53,6	54,0
ИЛ-4, пг/мл	34,62	93,4	92,5
ИЛ-1 $\beta$ , пг/мл 13,93		496,0 $p=0,000259$	447,7 $p=0,000013$
ФНО- $\alpha$ , пг/мл	28,25	136,4	115,0 $p=0,0015113$

Примечание: достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами доноров и больных ХГС с антиNS5 HCV + и антиNS5 HCV — отмечены уровнем  $p$ .

#### Выводы

У больных ХГС отмечается увеличение уровня исследованных цитокинов сыворотки при сравнении с донорами (достоверно при исследовании ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ ) и их содержание возрастало с увеличением гистологической активности. У пациентов с выявленными антиNS5 уровень ИЛ-1 $\beta$  был достоверно выше, чем у больных ХГС, у которых эти антитела не регистрировались. Уровень ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке у больных с умеренной активностью ХГС был достоверно выше, чем у больных с минимальной активностью, что отражает активность процесса воспаления в печеночной ткани. У больных с признаками склероза в биоптате печени уровни исследованных цитокинов в сыворотке также были выше, чем у доноров. Достоверные отличия от доноров отмечались у пациентов с различной степенью склероза при определении ИЛ-1 $\beta$  и у больных с тяжелой степенью склероза также и при исследовании уровней ИЛ-2 и ФНО- $\alpha$ , что свидетельствует о

**Таблица 3**

**Уровни цитокинов в сыворотке при ХГС в зависимости от гистологической активности**

Цитокин	доноры n=10	Минимальная активность, n=30	Умеренная активность, n=12
ИЛ-2, пг/мл	20,86	43,76	86,8
ИЛ-4, пг/мл	34,62	45,68	102,38
ИЛ-1 $\beta$ , пг/мл 13,93		111,50 (p=0,000733)	970,63 (p=0,000772)
ФНО- $\alpha$ , пг/мл	28,25	73,29 (p=0,045613)	106,32

Примечание: достоверные различия (p<0,05) между группами доноров и больных ХГС различной гистологической активности отмечены уровнем p.

**Таблица 4**

**Уровни цитокинов в сыворотке при ХГС в зависимости от степени склероза**

Цитокин	доноры n=10	Склероз отсутствует, n=5	Слабый, n=27	Умеренный, n=7	Тяжелый, n=2
ИЛ-2, пг/мл	20,86	38,33	51,84	91,78	58,12 (p=0,031694)
ИЛ-4, пг/мл	34,62	17,46	39,79	188,19	51,10
ИЛ-1 $\beta$ , пг/мл 13,93	55,87	127,76	1461,67 (p=0,000472)	367,82 (p=0,0003417)	367,82 (p=0,031694)
ФНО- $\alpha$ , пг/мл	28,25	66,71	73,90	128,04	100,94 (p=0,031694)

Примечание: достоверные различия (p<0,05) между группами доноров и больных ХГС с различной степенью склероза отмечены уровнем p.

выраженности процессов фиброгенеза в ткани печени. Достоверно выше были уровни ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-4 у больных с умеренным склерозом при сравнении с пациентами, у которых определялся слабый склероз. Изменение уровня

провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных ХГС может иметь важное диагностическое и прогностическое значение и требует дальнейшего изучения.

## Литература

1. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. СПб.: Гиппократ, 1998; 156 с.
2. Курамшин Д.Х., Толоконская Н.П., Силков А.Н. и др. Содержание цитокинов Тх1 и Тх2 типа в сыворотке крови больных гепатитом С. Журн. микробиол., 2001; 1: 57-61.
3. Абдукадырова М.А. Прогностические маркеры хронизации вирусного гепатита С. Иммунология, 2002; 1: 47-54.
4. Ивашкин В.Т., Маммаев С.Н., Лукина Е.А. и др. Особенности иммунного ответа у больных хроническим вирусным гепатитом С. Рос. журн. гастроэнтерол., 2001; 3: 24-29.
5. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практич. рук.: Пер. с англ. — М.: — Гэотар Медицина, 1999—864 с.
6. Справочник по иммунотерапии для практического врача. (Под ред. Симбирцева А.С.) — М.: — Диалог, 2002; — 480 с.
7. Пинцани М. Эволюция фиброза печени: от гепатита к циррозу. Рос. журн. гастроэнтерол., 2002; 5: 4-9.
8. Журкин А.Т., Фирсов С.Л., Маркова М.В. Влияние интерлейкина-2 на иммунологические и биохимические показатели больных гепатитом С. Эпидемиология и инфекционные болезни, 2001; 5: 28-31.
9. Склад Л.Ф., Маркелова Е.В. Клинико-иммунологическая эффективность применения ронколейкина при лечении хронического вирусного гепатита С. Здравоохранение Урала, 2002; 5 (11): 39-43.
10. Яговдик-Тележная Е.Н. Состояние системы интерлейкинов-1 и -2 при вирусных гепатитах. Автореф... к.м.н. — Минск, 1999.
11. Круглов И.В., Знойко О.О., Огиенко О.Л. и др. Спектр антител к различным антигенам HCV при разных вариантах течения хронической HCV-инфекции. Вопросы вирусологии, 2002; 2: 11-16.
12. Новиков А.А., Цыган В.Н., Никитин В.Ю. и др. Дифференциальная лабораторная иммунодиагностика вирусных гепатитов: Методические рекомендации. — М., 2002. — 80 с.
13. Ющук Н.Д., Огиенко О.Л., Круглов И.В. и др. Диагностическая значимость определения антител к различным антигенам вируса гепатита С у пациентов с острой и хронической HCV-инфекцией. Тер. Архив, 2002; 4: 18 — 22.
14. Радченко В.Г., Шабров А.В., Нечаев В.В. Хронические заболевания печени (этиология, клиника, диагностика, лечение, эпидемиология и профилактика). — СПб.: Издательство «Лань», 2000. — 192 с.
15. Lohr H.F., Elste C., Dienes H.P. et al. The quantitative humoral immune response to the hepatitis C virus is correlated with disease activity and response to interferon-alpha. J. Hepatol., 1996; Vol. 25, 3: 292-300.
16. Garrido A., Lepe J.A., Guerrero F.J., Palomo S. Serologic response against hepatitis C virus as a predictive factor to the treatment with interferon. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 2000; Vol. 18, 10: 512-515.
17. Серов В.В., Севергина Л.О. Морфологические критерии оценки этиологии, степени активности и стадии процесса при вирусных хронических гепатитах В и С. Архив патологии, 1996; 4: 61-64.