

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

© Малий В.П., Тимкович М.А., 2006  
УДК 616.36-002:578.891]-07:575.22(477.87)

**В.П. Малий, М.А. Тимкович**

# **ДИНАМІКА ЦИТОКІНОВОГО ПРОФІЛЮ У ПАЦІЄНТІВ З ГОСТРИМ І ХРОНІЧНИМ ГЕПАТИТОМ В ЗАЛЕЖНО ВІД ВСТАНОВЛЕНОГО ГЕНОТИПУ HBV**

Харківська медична академія післядипломної освіти, Ужгородський національний університет

*Встановлено домінуючі в Закарпатському регіоні циркуляції генотипів D й A HBV у пацієнтів з гострою та хронічною HBV-інфекцією. Вивчено динаміку прозапальних і протизапальних цитокінів у таких хворих залежно від встановленого генотипу вірусу гепатиту В.*

Незважаючи на досягнуті успіхи у вивченні проблеми гострих і хронічних вірусних гепатитів деякі механізми імунопатогенезу та прогресування HBV-інфекції продовжують залишатися складними для розуміння і потребують подальшого вивчення [1-4].

За даними літератури, перебіг гострого гепатиту В (ГГВ), активність хронічного гепатиту В (ХГВ) та їх наслідки залежать від стану імунної системи макроорганізму. Відомо, що ураження гепатоцитів і розвиток вогнищ запалення в тканині печінки зумовлені не прямою цитопатичною дією HBV, а опосередкованою і реалізується шляхом активації імунокomпетентних клітин. При цьому протівірусний імунітет значною мірою визначається продукцією цими імунокomпетентними клітинами біологічно активних речовин – цитокінів, які є медіаторами міжклітинної взаємодії в механізмах ураження печінки, розвитку системної запальної відповіді й активації фіброзоутворення в печінці [2, 3, 5, 6].

На думку більшості дослідників, основне значення в патогенезі HBV-інфекції має Т-клітинна імунна відповідь організму, що є предметом детального вивчення в останні роки. Вважається, що від переваги тих чи інших цитокінів залежить модуляція імунної відповіді за клітинним чи гуморальним напрямками. Відомо, що характер імунної відповіді залежить від домінуючої участі клонів Т-лімфоцитів-хелперів 1-го (Тх1) або 2-го (Тх2) типів, які розрізняються за цитокінами, що ними продукуються, і стимулюючій ролі в розвитку імунної відповіді за клітинним або гуморальним типом.

Активация Тх1 клону – продуцента інтерферону- $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ), інтерлейкіну-2 (ІЛ-2), фактора некрозу пухлини (ФНП- $\alpha$  і  $\beta$ ) веде до стимуляції ефektorних функцій Т-лімфоцитів (насамперед цитотоксичних CD8+ Т-лімфоцитів) і макрофагів й розвитку імунної відповіді за клітинним типом, що відіграє вирішальну роль в елімінації вірусів та інших внутрішньоклітинних патогенів. Тх2-лімфоцити-хелпери секретують ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-9, ІЛ-10 і ІЛ-13 і контролюють гуморальну ланку імунітету з продукцією антитіл майже винятково ІgG1 класу, які неспроможні нейтралізувати вірус, що є одним з факторів тривалої персистенції вірусу в організмі та розвитку імунопатологічного захворювання [1, 5, 7, 8].

Дослідженнями останніх років показано, що порушення балансу продукції цитокінів Тх1/Тх2 клітинами відіграє важливу роль в імунопатогенезі HBV-інфекції. Більшість дослідників сходяться на думці, що переважання цитокінів, продуцентів Тх2 клітин, асоціюється з вірусною персистенцією та хронізацією процесу при HBV-інфекції, а Тх1 – зі спонтанним видужанням й елімінацією збудника [5, 6]. Слід окремо відзначити, що думки вчених щодо цитокінової мережі та імунного реагування при гострій та хронічній HBV-інфекції суперечливі й неоднозначні, а вітчизняні дані щодо взаємозв'язку між генотипом HBV та цитокіновим профілем у хворих з гострою і хронічною HBV-інфекцією поодинокі (В.П. Малий, Т.І. Лядова). Це становить певний інтерес у проведенні генодіагностичних досліджень і вивченні комплексної оцінки цитокінового статусу хворих з гострою та хронічною HBV-інфекцією.

Враховуючи вищевказане, метою досліджень став аналіз цитокінового профілю і впливу встановленого генотипу HBV на динаміку цитокінової мережі та імунопатогенез гострої й хронічної HBV-інфекції.

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

### Матеріали і методи

Було обстежено 16 хворих на ГГВ та 24 хворих на ХГВ. Вік хворих коливався від 19 до 65 років, серед них жінок було 19, чоловіків – 21. Діагноз встановлювали на основі загальноприйнятих клініко-лабораторних, інструментальних методів дослідження. Всім хворим визначали спектр серологічних маркерів HBV-інфекції методом імуноферментного аналізу (ІФА): HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBcor IgM, anti-HBcor IgG. Виявлення ДНК HBV проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для генотипування HBV використовували метод аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів з використанням амплікона довжиною 470 пар нуклеотидів, що відповідає середній частині гену S HBV, та генотип-специфічних рестриктаз Bst 4Cl і Sse 9I. Рівень ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10 визначали твердофазним імуноферментним методом діагностичними тест-системами ООО «Протеїновий контур» (Санкт-Петербург).

Матеріалом для досліджень стала сироватка крові хворих на ГГВ і ХГВ, отримана в період розпалу хвороби і реконвалесценції ГГВ та в період активації і відносної клініко-лабораторної ремісії ХГВ.

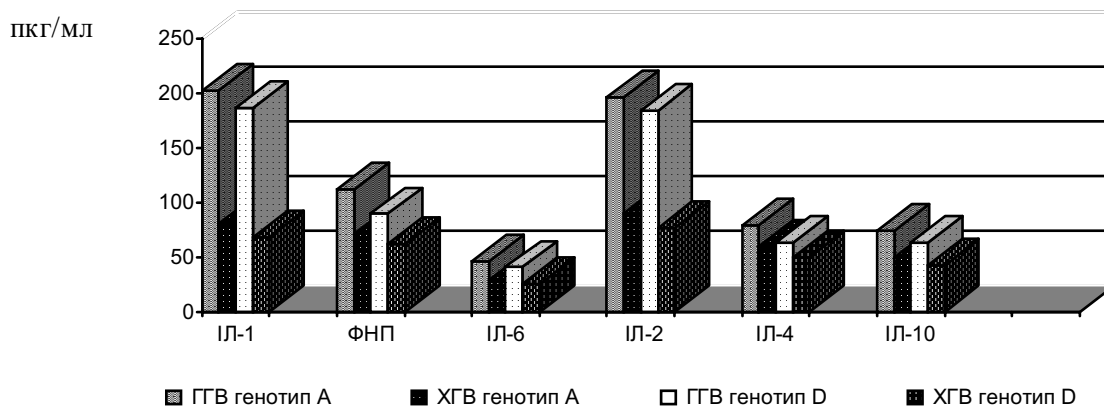
Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб віком від 18 до 35 років.

### Результати досліджень та їх обговорення

Серед обстежених хворих на ГГВ генотип А HBV виявлено у 7 пацієнтів (43,7 %), а генотип D HBV – у 9 (56,3 %). В обстежених осіб із ХГВ генотип А HBV діагностований у 14 (58,3 %), генотип D HBV – у 10 (41,7 %).

Проведені дослідження динаміки цитокинової мережі виявили деякі зміни в цитокиновому профілю у хворих з різними генотипами HBV як з гострою, так і з хронічною HBV-інфекцією.

У період розпалу ГГВ та у період активації ХГВ, зумовлених генотипом А HBV, було відмічено підвищення прозапальних і протизапальних цитокинів, порівняно з відповідними даними у хворих, інфікованих генотипом D HBV, що, можливо, і пояснює деякою мірою припущення про виражену «агресивність» генотипу А порівняно з генотипом D HBV (мал. 1, табл. 1, 2).



Мал. 1. Рівень показників досліджуваних цитокинів хворих у період розпалу ГГВ та активації ХГВ з різними генотипами HBV

Таблиця 1

Рівні цитокинів у розпал ГГВ хворих з різними генотипами HBV ( $M \pm m$ )

Показник, пкг/мл	Генотип А (n=7)	Генотип D (n=9)
ІЛ-1 $\beta$	202,1 $\pm$ 12,2	186,2 $\pm$ 14,1
ФНП- $\alpha$	112,3 $\pm$ 8,3*	89,4 $\pm$ 12,1
ІЛ-6	46,1 $\pm$ 7,6	40,8 $\pm$ 9,8
ІЛ-2	196,5 $\pm$ 17,2	183,7 $\pm$ 16,3
ІЛ-4	79,6 $\pm$ 9,7	71,1 $\pm$ 10,5
ІЛ-10	74,1 $\pm$ 8,4	63,7 $\pm$ 9,8

Таблиця 2

Рівні цитокинів у період активації ХГВ хворих з різними генотипами HBV ( $M \pm m$ )

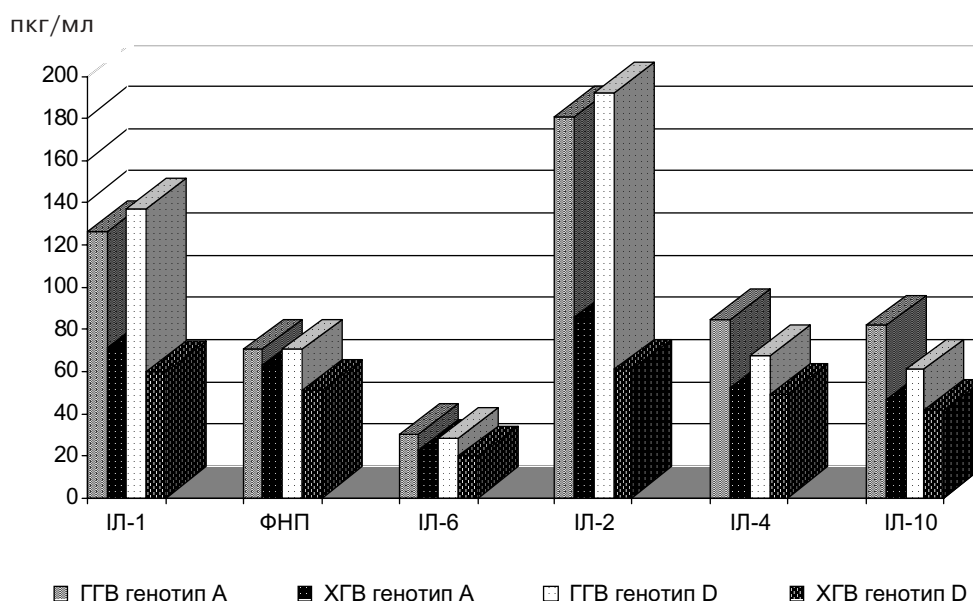
Показник, пкг/мл	Генотип А (n=14)	Генотип D (n=10)
ІЛ-1 $\beta$	80,2 $\pm$ 12,2	68,7 $\pm$ 14,1
ФНП- $\alpha$	71,1 $\pm$ 8,3	62,3 $\pm$ 7,1
ІЛ-6	29,4 $\pm$ 6,6	25,6 $\pm$ 5,8
ІЛ-2	90,1 $\pm$ 11,2	76,9 $\pm$ 10,3
ІЛ-4	59,8 $\pm$ 7,7	50,1 $\pm$ 8,5
ІЛ-10	50,2 $\pm$ 8,4	42,3 $\pm$ 7,8

Примітка (тут і далі). \* –  $P < 0,05$  порівняно зі значення ми генотипу D.

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Відомо, що основне місце серед прозапальних цитокінів, які беруть участь в імунопатогенезі HBV-інфекції, є ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6. Проаналізувавши динаміку вказаних прозапальних цитокінів, були встановлені високі рівні у пацієнтів з генотипом А HBV у період розпаду ГГВ, а в період реконвалесценції рівні ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6 були вищими у хворих з генотипом D. Оскільки ці прозапальні цитокіни входять у набір імунорегуляторних молекул, характерних для Тх1 клону лімфоцитів,

підвищені їх сироваткові концентрації можуть відображати посилення активності Т-хелперних клітин першого типу. Це підтверджує той факт, що вірусна інфекція активує передусім клітинну ланку імунного реагування організму. Але в наших спостереженнях була помітна трохи запізнена і більш ефективна Тх1 клітинна активність у пацієнтів з ГГВ з генотипом D. Це підтверджується також високим рівнем регуляторного цитокіну ІЛ-2 у хворих на ГГВ з генотипом D.



Мал. 2. Рівень показників досліджуваних цитокінів у період реконвалесценції ГГВ та ремісії ХГВ з різними генотипами HBV.

При ГГВ з генотипом А HBV спостерігали одночасну активацію клітинних (підвищення рівня ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6, ІЛ-2) і гуморальних (підвищення рівнів ІЛ-4, ІЛ-10) імунозапальних реакцій, з подальшим переважанням у період реконвалесценції імунорегуляторних молекул Тх2 клону лімфоцитів (ІЛ-4, ІЛ-10), що, можливо, може бути однією з причин подальшої персистенції HBV (мал. 2, табл. 3, 4).

Таблиця 3

Рівні цитокінів у період реконвалесценції у хворих на ГГВ з різними генотипами HBV ( $M \pm m$ )

Показник, пкг/мл	Генотип А (n=7)	Генотип D (n=9)
ІЛ-1 $\beta$	126,2 $\pm$ 10,2	136,7 $\pm$ 9,1
ФНП- $\alpha$	70,1 $\pm$ 9,3	69,8 $\pm$ 8,2
ІЛ-6	30,3 $\pm$ 7,2	28,1 $\pm$ 6,8
ІЛ-2	180,7 $\pm$ 11,1	191,6 $\pm$ 10,3
ІЛ-4	83,9 $\pm$ 12,7	67,3 $\pm$ 11,5
ІЛ-10	81,1 $\pm$ 7,4*	60,1 $\pm$ 8,6

Таблиця 4

Рівні цитокінів у період ремісії ХГВ хворих з різними генотипами HBV ( $M \pm m$ )

Показник, пкг/мл	Генотип А (n=14)	Генотип D (n=10)
ІЛ-1 $\beta$	71,3 $\pm$ 10,2	59,3 $\pm$ 11,1
ФНП- $\alpha$	62,7 $\pm$ 9,3	50,8 $\pm$ 9,1
ІЛ-6	22,2 $\pm$ 7,6	19,7 $\pm$ 6,8
ІЛ-2	85,6 $\pm$ 11,6	60,5 $\pm$ 10,3
ІЛ-4	51,9 $\pm$ 7,7	49,4 $\pm$ 8,5
ІЛ-10	46,4 $\pm$ 8,4	41,1 $\pm$ 7,8

Слід відзначити, що у хворих на ХГВ, інфікованих генотипом А, були виявлені вищі рівні про- та протизапальних цитокінів, порівняно з відповідними показниками у хворих на ХГВ з генотипом D. Але, якщо у пацієнтів з генотипом D у період клініко-лабораторної ремісії ХГВ було встановлено достовірне зниження сироваткової концентрації досліджуваних цитокінів, то у хворих на ХГВ з генотипом А такої достовірної тенденції до зниження встановлено не було. Це, можливо, підтверджує

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

думку деяких авторів про те, що для генотипу А HBV при ХГВ характерний вищий ступінь активності патологічного процесу з підтримкою вірусної реплікації та прогресуванням хронізації процесу, порівняно з генотипом D HBV (K. Mayerat et al., 1999).

Варто окремо зупинитися на динаміці регуляторного цитокіну ІЛ-2 у хворих на ГГВ та ХГВ. У досліджуваних групах цей показник був вищим приблизно у 7-9 разів при ГГВ і у 3-5 разів при ХГВ, порівняно з відповідним рівнем ІЛ-2 у контрольній групі ( $P < 0,05$ ).

У хворих на ГГВ з генотипом D рівень ІЛ-2 був вищим за відповідний показник у пацієнтів з генотипом А, що, ймовірно, підсилює активність цитокінів Тх1 клону лімфоцитів і надалі призводить до стабілізації інфекційного процесу у пацієнтів з генотипом D HBV. У хворих на ГГВ з генотипом А дещо нижчий рівень ІЛ-2 створив дисбаланс у системі Тх1/Тх2 лімфоцитів з перевагою проліферації цитокінів Тх2 клону, що у наших дослідженнях підтвердили підвищення рівнів ІЛ-4 та ІЛ-10 ( $P < 0,05$ ).

У пацієнтів з ХГВ не було виявлено значних змін динаміки ІЛ-2 залежно від встановленого генотипу HBV, але рівень ІЛ-2 був помірно високим як у період активації, так і в період ремісії хворих на ХГВ, порівняно з відповідними даними у контрольній групі. Таким чином, при ХГВ, на відміну від ГГВ, помірна й тривала сироваткова концентрація ІЛ-2 не тільки не призвела до суттєвого збільшення концентрації ряду прозапальних цитокінів (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ ), а й поглибила дисбаланс між окремими цитокінами з незначним збільшенням протизапальних (ІЛ-4, ІЛ-10) цитокінів, що підтверджує наявність гуморального імунодефіциту при хронічній HBV-інфекції.

За даними літератури [3, 6, 8], хронізація процесу при HBV-інфекції призводить до зменшення рівнів прозапальних і протизапальних цитокінів, що було відмічено і в наших дослідженнях, порівняно з групою хворих на ГГВ, хоча сироваткова концентрація досліджуваних цитокінів у пацієнтів на ХГВ перевищувала відповідні рівні в контрольній групі.

Відомо, що перебіг і результат HBV-інфекції залежать від стану імунної системи макроорганізму, при цьому противірусний імунітет значною мірою залежить від продукції цитокінів. Кінцевий результат біологічної дії цитокінів визначається їх кількісним вмістом, тимчасовою послідовністю синтезу різних цитокінів, взаємодією між собою. Дисбаланс у системі цитокінового регуляторного ланцюга є ключовою ланкою імунних порушень при

захворюваннях печінки, а незбалансованість продукції цитокінів Т-хелперами 1-го і 2-го типів відіграє важливу роль в імунопатогенезі хронізації та прогресуванні HBV-інфекції.

### Висновки

1. Цитокіновий профіль у хворих з гострою та хронічною HBV-інфекцією має певні особливості залежно від генотипу HBV, а останній, у свою чергу, може бути одним з факторів впливу на динаміку прозапальних і протизапальних цитокінів.

2. Дослідження генотипу HBV та визначення динаміки сироваткової концентрації прозапальних і протизапальних цитокінів у хворих з гострою й хронічною HBV-інфекцією можуть служити допоміжними критеріями для прогнозування перебігу та вислідів захворювання.

### Література

1. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – Киев: Наукова думка, 1998. – 156 с.
2. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о защите организма от инфекции // Иммунология. – 2000. – № 1. – С. 61-64.
3. Царегородцева Т.М., Серова Т.И. Цитокины в гастроэнтерологии. – М.: Анахарсис, 2003. – 150 с.
4. Hollinger F.B. Hepatitis B virus // Fields B.N. et al. Virology. – New York: Raven Press, 1990. – P. 2171-2236.
5. Ройт А. Основы иммунологии: Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 328 с.
6. Milich D.R. Pathobiology of acute and chronic hepatitis B virus infection: an introduction // J. Viral Hepat. – 1997. – V. 4. – P. 25-30.
7. Грачова Л.А. Цитокины в онкогематологии. – М.: Алтис, 1996. – 168 с.
8. Kao J.H., Chen P.J., Las M.Y. et al. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection // J. Clin. Microbiol. – 2002. – V. 40. – P. 1207-1209.

### THE CYTOKINE PROFILE DYNAMICS IN PATIENTS WITH ACUTE AND CHRONIC HEPATITIS DEPENDING ON ESTABLISHED HBV GENOTYPES

V.P. Malyy, M.A. Tymkovych

*SUMMARY. In the result of the provided research the domination in the Transcarpathian region HBV genotypes D and A circulations in the patients with acute and chronic HBV-infection were set up and the dynamics of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in such patients depending on the established genotype of hepatitis B virus was studied.*