

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

© Рябоконт О.В., 2005
УДК 616.36-002.2-097-085.244

О.В. Рябоконт

ЦИТОКІНОВИЙ СТАТУС ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С ПРИ РІЗНИХ РЕЗУЛЬТАТАХ ІНТЕРФЕРОНОТЕРАПІЇ

Запорізький державний медичний університет

У результаті проведених досліджень серед хворих на хронічний гепатит С (ХГС), що одержали 6-місячний курс терапії лафероном, виявлено зміну балансу цитокінів у бік посилення клітинної імунної відповіді та уповільнення процесів фіброзування печінки. У пацієнтів з повною первинною та біохімічною ремісією виявлене достовірне підвищення вмісту ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-12 при зниженні ІЛ-4 і TGF-1 β порівняно з такими показниками до лікування.

HCV-інфекція є основною причиною формування хронічного гепатиту, цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми, великий ризик розвитку яких і відсутність засобів специфічної профілактики диктують необхідність ранньої противірусної терапії. Найбільш складною і важливою проблемою гепатиту С є лікування його хронічної форми. За даними літератури [1], перебіг і результат ХГС залежать від стану імунної системи макроорганізму, при цьому противірусний імунітет значною мірою визначається продукцією цитокінів – біологічно активних речовин, які продукуються імуннокомпетентними клітинами у відповідь на інфект. Вплив цитокінів на клітину супроводжується, як правило, активацією клітин, їх диференціюванням і/або проліферацією [2]. Дисбаланс у системі цитокінового регуляторного ланцюга – ключова ланка імунних порушень при захворюваннях печінки [3]. Кінцевий результат біологічного ефекту цитокінів визначається їх кількісним вмістом, тимчасовою послідовністю синтезу різних цитокінів, взаємодією між собою [4]. У цей час як причини тривалої персистенції HCV розглядають дисбаланс продукції цитокінів, синтезованих Т-хелперами (Тх) 1 та 2 типів, і порушення презентації антигенів вірусу антигенопрезентуючими клітинами [3]. У даному аспекті раціональним є використання препаратів інтерферону (ІФН), які мають широкий спектр імунологічної активності. Серед рекомбінантних ІФН широко використовується інтрон А – ІФН- α 2b (Шерінг Плау), роферон А –

ІФН- α 2a (Roche) та ін. Лікування цими препаратами є важкою фінансовою проблемою для хворих і охорони здоров'я. Практично відсутні дані про вплив ІФН- α 2b вітчизняного виробництва (лаферон, Київ) на цитокіновий статус хворих на ХГС.

Мета роботи – вивчити динаміку сироваткових рівнів цитокінів ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-12 і трансформуючого фактора росту (TGF-1 β) залежно від результатів лікування хворих на ХГС лафероном.

Матеріали і методи

Під спостереженням у гепатологічному центрі обласної інфекційної клінічної лікарні м. Запоріжжя перебувало 48 хворих на ХГС віком від 18 до 53 років (32 чоловіки, 16 жінок). Етіологічно діагноз підтверджено кількарізним виявленням у сироватці крові антитіл до вірусу гепатиту С (анти-HCVcor IgM, анти-HCV IgG) методом ІФА та RNA HCV методом ПЛР. Маркери гепатитів В (HBsAg, HBeAg, анти-HBScor IgM, DNA HBV) та А (анти-HAV IgM) у крові обстежуваних були відсутні.

Всі пацієнти отримали 6-місячний курс монотерапії рекомбінантним інтерфероном- α 2b (лаферон, Київ) внутрішньом'язово в дозі по 3 млн ОД 10 днів поспіль, потім по 3 млн ОД 3 рази на тиждень. У всіх пацієнтів на момент початку ІФН-терапії активність АлАТ була підвищена, у крові RNA HCV (+). Для оцінки ефективності противірусної терапії використовували критерії, прийняті Європейською групою з вивчення гепатиту [5]. Ефективність лікування оцінювали за динамічним спостереженням за активністю АлАТ і даними ПЛР-дослідження крові на наявність HCV- RNA. Виділяли біохімічну ремісію (нормалізація АлАТ), вірусологічну ремісію (негативний результат дослідження крові на наявність HCV- RNA), первинну ремісію (на момент завершення ІФН-терапії). Залежно від результатів лаферонотерапії хворі на ХГС були розділені на три групи: I – 15 пацієнтів з повною первинною ремісією (через 6 міс. ІФН-терапії нормалізувалася активність АлАТ, у крові HCV- RNA(-)), II група – 17 хворих із первинною біохімічною ремісією (нормалізувалася активність АлАТ, у крові зберігалася HCV- RNA(+)), III група – 15 хворих, що не відповіли на ІФН-терапію (наявність у крові HCV- RNA(+), підвищена активність АлАТ). В 1 пацієнтки спостерігалася

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

лише вірусологічна ремісія за відсутності первинної біохімічної відповіді.

У всіх пацієнтів визначали вміст у сироватці крові цитокінів відповідно до методик, запропонованих виробниками, використовуючи *ELISA*-набори для кількісного виміру: *ProCon* (Росія) – для визначення ІЛ-2 і ІЛ-4; *BIOSOURCE* (*EUROPE S.A.*) – для визначення ІЛ-12; *DIACLONE* (Франція) – для визначення ІЛ-6; *DRG* (Німеччина) – для визначення TGF-1 β . Метод імуоферментного аналізу проведено з використанням приладу *DigiScan-400* (Австрія). Контрольну групу склали 25 здорових осіб.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми «*Microsoft Excel*». Обчислювали середні значення (M), середні помилки середньої арифметичної (m), оцінювали результати за допомогою критерію Стюдента, вираховували відсоток відхилення показників у групах порівняння.

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті проведеної протягом 6 міс. лаферонотерапії самопочуття у всіх хворих покращилося, у 15 (31,3 %) хворих на ХГС сформувалася первинна повна ремісія, що говорило про доведений ефект ІФН-терапії. У 17 (35,4 %) пацієнтів зареєстрована біохімічна ремісія. В цілому у 32 (66,7 %) пацієнтів через 6 міс. ІФН-терапії виявлена нормалізація активності АлАТ. Основним фактором, що бере участь у канцерогенезі печінки, є не елімінація вірусу, а профіль АлАТ, і навіть якщо ІФН-терапія не привела до вірусологічної ремісії, підтримка низьких рівнів АлАТ знижує ризик розвитку гепатоцелюлярної карциноми при ХГС [6]. У 15 (31,3 %) хворих на ХГС, незважаючи

на поліпшення загального стану, ні біохімічної, ні вірусологічної ремісії не спостерігалось.

Продовжуючи початі раніше дослідження [7, 8], що вказують на вірогідно низький вміст у сироватці крові хворих на ХГС ІЛ-2, ІЛ-6 і високий ІЛ-4 і TGF-1 β , був вивчений вміст даних цитокінів та ІЛ-12 у сироватці крові хворих на ХГС, які одержали протягом 6 міс. лаферонотерапію. На фоні лікування у всіх пацієнтів спостерігалось зрушення балансу цитокінів у бік посилення клітинної імунної відповіді і уповільнення процесів фіброзування печінки. Аналіз імунологічних показників у спостережуваних осіб показав, що на фоні лікування лафероном при повній первинній і біохімічній ремісії було достовірне підвищення вмісту ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-12 при достовірному зниженні ІЛ-4 і TGF-1 β , тоді як у хворих, що не відповіли на лікування нормалізацією АлАТ і зникненням із крові HCV- RNA, зареєстроване лише достовірне підвищення вмісту ІЛ-6 і зниження ІЛ-4 при тенденції до підвищення кількості ІЛ-2, ІЛ-12 і зниження TGF-1 β порівняно з показниками до лікування (табл. 1).

При порівняльному аналізі вмісту досліджуваних цитокінів у сироватці крові хворих на ХГС виявлено, що в осіб I групи вміст секретованого макрофагами ІЛ-12 збільшився на 125,5 %, у хворих з біохімічною ремісією – на 58,5 %, тоді як у представників III групи – лише на 16,1% стосовно даного показника до лікування. До того ж, у пацієнтів з повною первинною ремісією на момент завершення ІФН-терапії вміст ІЛ-12 у сироватці крові вірогідно не відрізнявся від такого у практично здорових осіб контрольної групи (187,64 \pm 7,15 проти 195,41 \pm 11,77 пкг/мл, P>0,05).

Таблиця 1

Вміст цитокінів у сироватці крові хворих на ХГС при різних результатах монотерапії лафероном (M \pm m)

Показник	Хворі на ХГС до лікування (n=48)	Хворі на ХГС після ІФН-терапії (n=47)		
		I група (n=15)	II група (n=17)	III група (n=15)
ІЛ-12, пкг/мл	83,20 \pm 4,56	187,64 \pm 7,15*	131,85 \pm 6,69* **	96,57 \pm 7,49** #
ІЛ-2, МО/мл	89,61 \pm 4,51	166,01 \pm 9,23*	129,55 \pm 8,73* **	101,29 \pm 9,13** #
ІЛ-4, пкг/мл	152,74 \pm 6,41	52,70 \pm 8,78*	61,85 \pm 7,67*	98,78 \pm 8,41* ** #
ІЛ-6, пкг/мл	1,91 \pm 0,09	3,38 \pm 0,18*	3,01 \pm 0,15*	2,69 \pm 0,17* **
TGF-1 β , пкг/мл	3261,37 \pm 93,83	2128,51 \pm 114,13*	2326,57 \pm 101,14*	3024,31 \pm 121,58** #

Примітки: * – різниця достовірна порівняно з показниками хворих до лікування; ** – з показниками хворих I групи; # – з показниками хворих II групи (P<0,05).

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Збільшення на фоні лаферонотерапії вмісту ІЛ-12 у сироватці крові хворих на ХГС свідчить про активацію клітинної ланки імунної відповіді. Одним з найважливіших ефектів ІЛ-12 є здатність направляти диференціювання CD4⁺ лімфоцитів у бік Тх 1 типу, підсилювати адгезивність і цитотоксичну активність CD16⁺ лімфоцитів та їх проліферацію [1]. Можна вважати, що достовірне підвищення ІЛ-12, секретованого макрофагами, у сироватці крові хворих на ХГС побічно свідчить про посилення функціональної активності макрофагів і можливе поліпшення презентації цими клітинами антигенів вірусу CD4⁺ клітинам. Цей показник, на наш погляд, може бути використаний як об'єктивний імунологічний критерій ефективності ІФН-терапії у хворих на ХГС.

Наявність активації імунної відповіді за клітинним типом під дією лаферону у хворих на ХГС підтверджує і достовірне збільшення вмісту ІЛ-2 в разі повної первинної та біохімічної ремісії, при достовірному зниженні вмісту ІЛ-4 у хворих даних груп порівняно з показниками до лікування (табл. 1).

Відповідно до сучасних досліджень відомо, що нормальна функція імунної системи будується на балансі вмісту Тх 1 типу, які продукують насамперед ІЛ-2, і Тх 2 типу, які секретують ІЛ-4, заснованому на рівномірній продукції даними клітинами регуляторних цитокінів [9]. Порушення динамічної рівноваги Тх 1 і Тх 2 клітин приводить до пригнічення адекватної імунної відповіді і відповідно не до елімінації інфікованих вірусом клітин, а до тривалого персистування вірусу в організмі і розвитку імунопатологічного захворювання [10]. ІЛ-2 – це пара- і автокринний регулятор процесів проліферації та диференціювання, насамперед, Т-лімфоцитів. Даний цитокін, до того ж, підвищує функціональну активність нормальних кілерів, макрофагів, які, у свою чергу, не тільки розпізнають і переробляють антиген, але й активують HLA DR антигени та здійснюють функції презентації антигену [11, 12]. ІЛ-4 відповідає за диференціювання Тх 0 в Тх 2 типу й опосередковану Тх 2 типу гуморальну відповідь [1].

Підвищення вмісту ІЛ-2 у хворих на ХГС з доведеною повною відповіддю на 6-місячний курс лаферонотерапії на 85,3 %, у хворих із біохімічною ремісією – на 44,6 % і зниження вмісту ІЛ-4 відповідно на 65,5 % у перших і на 59,5 % у других порівняно з аналогічними показниками до лікування свідчать про тенденцію до нормалізації Тх 1/Тх 2 цитокінового балансу за рахунок клітин-

ної імунної відповіді, яка є основною в елімінації вірусу при гепатиті С. ІФН-терапія, хоча і зменшує ступінь дисбалансу у бік Тх 2 типу у респондентів, але повністю не відновлює активність Тх 1 типу. Вміст ІЛ-2 у сироватці крові залишається вірогідно низьким: у хворих I групи 166,01±9,23, у хворих II групи 129,55±8,73 МО/мл порівняно з таким в осіб контрольної групи (212,62±10,37 МО/мл), а вміст ІЛ-4 вірогідно високим у хворих I групи – 52,70±8,78, у пацієнтів II групи – 61,85±7,67 проти (9,81±0,99) пкг/мл в осіб контрольної групи.

На жаль, досягти елімінації вірусу можливо далеко не у всіх хворих. Більш реальне завдання – загальмувати прогресування захворювання і зменшити ризик розвитку гепатоцелюлярної карциноми. Відомо, що формування фіброзу є результатом порушення балансу між процесами синтезу і розпаду позаклітинного матриксу з перевагою процесів утворення позаклітинних матричних комплексів. Клітинами-продуцентами всіх компонентів матриксу печінки є зірчасті клітини, які синтезують TGF-1β. Фіброгенний потенціал зірчастих клітин регулюють ІФН-γ, ІЛ-6, простагландини, під дією яких фіброгенез урівноважується процесами фібролізу за рахунок активації металопротеїназ [1, 9].

Достовірне зниження на фоні лаферонотерапії у хворих на ХГС з повною первинною ремісією вмісту TGF-1β на 34,7 %, а у пацієнтів з біохімічною ремісією на 28,7 % при достовірному підвищенні вмісту в сироватці крові ІЛ-6 у хворих I, II і III груп відповідно на 76,9, 57,6, 40,8 % порівняно з показниками до лікування свідчить, імовірно, про уповільнення процесів фіброгенезу при активації процесів фібролізу. До того ж, після закінчення курсу ІФН-терапії вміст ІЛ-6 у сироватці крові хворих на ХГС з доведеною відповіддю достовірно не відрізнявся від такого у практично здорових осіб контрольної групи – 3,38±0,18 проти (3,37±0,23) пкг/мл. Важливий антифібротичний ефект ІФН не залежить навіть від біохімічної ремісії [13]. Частота розвитку цирозу печінки після ІФН значно зменшується [14].

Висновки

1. У хворих на ХГС з повною первинною та біохімічною ремісією через 6 міс. ІФН-терапії виявлене достовірне підвищення вмісту ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-12 при достовірному зниженні вмісту ІЛ-4 і TGF-1β порівняно з показниками до лікування.

2. У хворих на ХГС, що не відповідали на лікування вірусологічною і біохімічною ремісією, на

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

фоні лаферонотерапії зареєстроване достовірне підвищення лише вмісту ІЛ-6, зниження ІЛ-4 при тенденції до підвищення вмісту ІЛ-2, ІЛ-12 і зниження TGF-1 β .

3. Показники цитокинового статусу, насамперед ІЛ-12 і ІЛ-6, можуть бути використані як об'єктивні імунологічні критерії ефективності лаферонотерапії у хворих на ХГС.

Література

1. Кашкин К.П. Цитокины иммунной системы: основные свойства и иммунобиологическая активность // Клин. лабор. диагностика. – 1998. – № 11. – С. 21-32.
2. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. – К.: Наукова думка, 1998. – 313 с.
3. Koziel M.J. Cytokines in Viral Hepatitis // Sem. Liver Disease. Thieme Medical Publishers. – 1999. – V. 19, N 2. – P. 157-169.
4. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практич. рук.: Пер. с англ. / Под ред. З.Г. Апросиной, Н.А. Мухина. – М.: Гэотар Медицина, 1999. – 864 с.
5. Рекомендации по лечению гепатита С (Согласительная конференция по лечению гепатита С, Париж, Франция, 27-28 февраля 2002 года) // Росс. журн. гепатол., гастроэнтерол., колопроктол. – 2003. – № 2. – С. 4-12.
6. Hayashi K, Kumada T, Nakano S. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C after interferon therapy // Hepatogastroenterology. – 2002. – V. 49, N 44. – P. 508-512.
7. Рябоконт О.В., Колесник Ю.М. Вміст у сироватці крові цитокинів Тх1 та Тх2 типів у хворих на хронічний гепатит С залежно від реплікативної активності вірусу // Лабораторна діагностика. – 2002. – № 4. – С. 11-13.
8. Рябоконт О.В., Колесник Ю.М., Туманський В.О. Вміст трансформуючого фактора росту 1 β і інтерлейкіну-6 у сироватці крові хворих на НСВ-інфекцію // Там само. – 2003. – № 3. – С. 6-9.
9. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М., 1999. – 604 с.
10. Сепиашвили Р.И. Функциональная система иммунного гомеостаза // Аллергология и иммунология. – 2003. – № 2. – С. 5-14.
11. Mosmann R.T., Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more // Immunology Today. – 1996. – V. 17. – P. 138-146.
12. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: «Eppur si muove!» // Eur. Cyt. Netw. – 1994. – V. 5. – P. 7-12.
13. Camma C., Giunta M., Linea C., Pagliaro L. The effect of interferon on the liver in chronic hepatitis C: a quantitative evaluation by meta-analysis // J. Hepatol. – 1997. – V. 26. – P. 1187-1199.
14. Loch T., Kozłowska J., Cianciara J. Procollagen – III peptide in chronic hepatitis type B and C treated with interferon alpha. Follow up study // Ibid. – 1997. – V. 26 (Suppl. 1). – P. 218-225.

CYTKINE STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C AT DIFFERENT RESULTS OF INTERFERON-THERAPY

O.V. Ryabokon

SUMMARY. As a result of the carried out researches among the patients with chronic hepatitis C, who received 6-month course of therapy with laferon, the change of cytokine balance aside amplifications of the cellular immune response and delay of the liver fibrosing processes is revealed. At patients with full primary and biochemical remission the authentic increase of IL-12, IL-2, IL-6 contents is revealed at decrease of IL-4 and TGF-1 β in comparison with similar parameters before treatment.