

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЕЙ КЛЮЧЕВЫХ МОЛЕКУЛ ФИБРОГЕНЕЗА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ HDV-ИНФЕКЦИИ

Б.С. Ильясова

Национальный Научный центр хирургии МЗ РК
(председатель Правления – д.м.н., проф. Баймаханов Б.Б.),
г. Алматы, Республика Казахстан

Резюме. Вирусный гепатит D считается самой тяжелой формой вирусного гепатита. Только 25% пациентов отвечают на терапию. Хроническая HDV-инфекция приводит к более тяжелому заболеванию печени, чем хроническая HBV-моноинфекция и ассоциируется с быстрым развитием фиброза и увеличением риска развития гепатоцеллюлярной карциномы, а также ранней декомпенсацией уже имеющегося цирроза печени.

Обследовано 105 пациентов с хроническим вирусным гепатитом дельта. Всем испытуемым были исследованы уровни ИЛ-12, фактор некроза опухоли альфа, ИЛ-17, ИЛ-10, трансформирующего фактора роста бета-1 в сыворотке методом ИФА (IBL (Германия)).

Результаты исследования уровня показали достоверное повышение ФНО-альфа, интерлейкина-10 в зависимости от стадии фиброза. Уровни ИЛ17, ИЛ12/23 и TGFβ1 оказались повышенным у пациентов со стадией фиброза F3-F4 в сравнении с пациентами со стадиями фиброза печени F0-F2. Обнаружены положительная статистически значимую связь уровня ФНОα и уровня интрелейкина-10 со стадией фиброза, с уровнем АЛТ, АСТ и отрицательную со значениями креатинина, мочевины, тромбоцитов и лейкоцитов.

Ключевые слова: гепатит дельта, цирроз печени, цитокины, ФНО-альфа, интерлейкина-10, интерлейкин17, TGFβ1.

RESULTS OF INVESTIGATION OF LEVELS OF KEY MOLECULES OF FIBROGENESIS
IN CHRONIC HDV-INFECTION

B.S. Ilyassova

National Scientific Center of Surgery, Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
(Chairman of the Board – Doctor of Medical Science, Prof. Baimakhanov B.B.),
Almaty, Republic of Kazakhstan

Summary. Viral hepatitis D is considered the most severe form of viral hepatitis. Only 25% of patients respond to therapy. Chronic HDV infection leads to a more severe liver disease than chronic HBV-monoinfection and is associated with rapid development of fibrosis and an increased risk of hepatocellular carcinoma, as well as early decompensation of an already existing liver cirrhosis.

105 patients with chronic viral hepatitis delta were examined. All subjects underwent IL-12 levels, tumor necrosis factor alpha, IL-17, IL-10, transforming growth factor beta-1 in serum by ELISA (IBL (Germany)).

The results of the level study showed a significant increase in TNF-alpha, interleukin-10, depending on the stage of fibrosis. Levels of IL17, IL12 / 23, and TGFβ1 were elevated in patients with F3-F4 fibrosis in comparison with patients with fibrous stage F0-F2. Positive statistically significant association of the level of TNF-α and the level of intreleukin-10 with the fibrosis stage, with the level of ALT, AST and negative with values of creatinine, urea, platelets and leukocytes was found.

Key words: hepatitis delta, liver cirrhosis, cytokines, TNF-alpha, interleukin-10, interleukin17, TGFβ1.

Введение

В 1977 году Марио Ризетто с соавт. [1] описали новый антиген в ядре гепатоцита, выделенного у пациента, инфицированного вирусом гепатита В. Такие антитела против дельта-антигена были обнаружены затем у пациентов с более тяжелым течением HBV-инфекции [2]. Вирусный гепатит D считается самой тяжелой формой вирусного гепатита. Варианты лечения гепатита дельта ограничены, и только 25% пациентов отвечают на те-

рапию пегилированным интерфероном. Хроническая HDV-инфекция приводит к более тяжелому заболеванию печени, чем хроническая HBV-моноинфекция и ассоциируется с быстрым развитием фиброза и увеличением риска развития гепатоцеллюлярной карциномы, а также ранней декомпенсацией уже имеющегося цирроза печени [2]. При наложении дельта-инфекции, как известно цирроз развивается на 10 лет раньше, чем при моноинфекции HBV [3].

Было установлено, что несколько провоспалительных цитокинов, таких как цитокины Th1 (Т хелперы 1 типа) – профили (включая IL-2 и IFN-гамма) и TNF-альфа участвуют в процессе вирусного клиренса и иммунного ответа хозяина на вирус гепатита В (HBV). IL-12 может быть важным у тех пациентов, у которых вирус HDV реплицируется, представленный положительной группой HDV. Показана положительная корреляция при HDV-инфекции IL-12 и IL-2, поляризация стандартного ответа клеток TH1 настоятельно предлагается пациентам, завершившим лечение [6]. И наоборот, Th2-цитокин IL-10 служит мощным ингибитором эффекторных клеток Th1 при HBV-инфекции. Интерлейкин-18 (IL-18), впервые описанный как фактор, индуцирующий интерферон (IFN) -гамма, является одним из членов суперсемейства IL-1 цитокинов [7, 8]. IL-18 модулирует ответ Th1 вместе с IL-12 для получения IFN-гамма [10]. Трансформирующий фактор роста бета-1 (TGFβ1) является многофункциональным цитокином. Существуют три основные направления его активности: I. TGFβ1 регулирует клеточную пролиферацию, рост, дифференцировку и движение клеток. II. TGFβ1 обладает иммуномодулирующими эффектами. III. TGFβ1 обладает профибротическими эффектами. Действие TGFβ1 может быть локальным и системным. TGF-β1 является потенциально профибротическим цитокином, вовлеченным в формирование фиброза печени. Проведено исследование уровней трансформирующего фактора роста и цитокинов в сыворотке у пациентов с вирусным гепатитом В и вирусным гепатитом В с дельта-агентом.

Цель исследования. Определить роль различных сигнальных молекул фиброгенеза в прогрессировании хронического вирусного гепатита В с дельта-агентом.

Материалы и методы

Обследовано всего 105 пациентов с хроническим вирусным гепатитом В с дельта-агентом и циррозом печени в исходе вирусного гепатита В.

Всем испытуемым были проведены следующие общеклиническое исследование, анализ крови, исследованы концентрации ИЛ-12, фактор некроза опухоли альфа, ИЛ-17, ИЛ-10, трансформирующего фактора роста бета-1 в сыворотке методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем производства IBL (Германия).

Был проведен сравнительный анализ результатов исследования уровня цитокинов в сыворотке пациентов в зависимости от стадии фиброза

При статистической обработке результатов применялись Н-критерий Крускала-Уолиса для сравнения в нескольких группах, U-критерий Манна-Уитни для сравнения 2-х групп, корреляционный анализ по методу Спирмена.

Результаты и их обсуждение.

Был проведен сравнительный анализ результатов исследования уровня цитокинов в сыворотке пациентов в зависимости от стадии фиброза

Результаты клинико-лабораторного исследования показали достоверное повышение билирубина в зависимости от стадии фиброза печени (P=0,004), а также достоверное понижение тромбоцитов (P=0,0001), достоверное повышение АЛТ (P=0,040), АСТ (P=0,004).

Таблица 1

Клинико-лабораторные показатели пациентов в зависимости от стадии фиброза

	Возраст	АЛТ	АСТ	Билирубин	Тромбоциты	Лейкоциты
F0, N=14	41,5±11,364	18,042±21,44	12,06±14,08	13,63±5,0	174,29±81.3	38,94±14.5
F1, N=9	42,89±10,64	16,04±25,79	13,56±19	12,43±2,8	160,40±62.74	4,43±1,37
F2, N=21	41,69±13.67	44,31±62,32	41,65±19,9	14,76±6.92	173,24±58,36	4,85±1,59
F3, N=27	43,60±11,50	28,85±28,11	56,31±13.9	17,85±8.91	56,08±33,85	21,96±14.35
F4, N=32	43,94±14.11	52,64±52.29	54,74±47,35	32,48±14.9	45,59±52,5	8,57±4.9
p*	0,932	0,04	0,004	0,004	0,0001	0,001

Таблица 2

Уровни цитокинов в крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В+D на различных стадиях фиброза

	ФНО α Пг/мл	ИЛ10 Пг/мл	ИЛ17 Пг/мл	ИЛ12/ИЛ23 Пг/мл	TGF β 1 нг/мл
F0, N=14	32,95 \pm 17,65	4,44 \pm 3,13	21,83 \pm 10,81	1486,58 \pm 706,93	791,74 \pm 893,03
F1, N=9	29,07 \pm 16,34	3,64 \pm 2,95	21,43 \pm 6,71	1666,67 \pm 476,97	546,11 \pm 813,560
F2, N=21	35,17 \pm 17,27	5,59 \pm 3,99	23,83 \pm 13,74	1742,38 \pm 597,61	873,05 \pm 806,91
F3, N=27	38,96 \pm 13,88	7,84 \pm 5,50	17,72 \pm 7,21	1787,48 \pm 577,53	1061,72 \pm 782,84
F4, N=32	47,59 \pm 21,42	12,75 \pm 11,63	26,18 \pm 45,36	1687,24 \pm 682,81	1149,94 \pm 733,65
p	0,009	0,002	0,160	0,278	0,315

Результаты исследования уровня сигнальных молекул фиброгенеза показали достоверное повышение ФНО-альфа (P=0,009), интерлейкина-

10 (P=0,002) в зависимости от стадии фиброза (табл. 2, рис. 1).

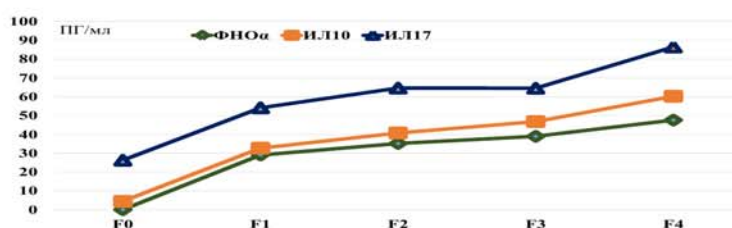


Рисунок 1. Уровни цитокинов в крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В+D на различных стадиях фиброза.

Уровни ИЛ17, ИЛ12/23 и TGF β 1 также оказались повышенным у пациентов со стадией фиброза F3-F4 в сравнении с пациентами со стадиями

фиброза печени F0-F2, однако достоверности изменений нет (табл. 2, рис. 1, 2).

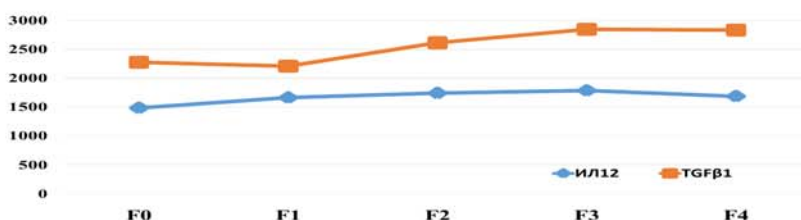


Рисунок 2. Уровни цитокинов и профибротических факторов в крови у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В+D на различных стадиях фиброза

Корреляционный анализ показал положительную статистически значимую связь уровня ФНО α и уровня интерлейкина-10 со стадией фиброза ($r=0,341$, $P<0,0001$ и $r=0,375$, $P<0,0001$, соответственно). Значение ФНО α имеет положительную статистически значимую корреляционную связь с уровнем АЛТ ($r=0,358$, $P<0,0001$), АСТ ($r=0,452$, $P<0,0001$) в крови и отрицательную со значениями креатинина ($r=-0,396$, $P=0,002$), мочевины ($r=-0,280$, $P=0,019$), тромбоцитов ($r=-0,290$, $P=0,005$); и лейкоцитов ($r=-0,342$, $P=0,001$).

Активность интерлейкина-10 в крови пациентов имеет положительную статистически значимую корреляционную связь с уровнем АЛТ

($r=0,256$, $P=0,004$), АСТ ($r=0,380$, $P<0,0001$), билирубина в крови ($r=0,194$, $P=0,037$), и отрицательную со значениями альбумина ($r=-0,586$, $P=0,005$), креатинина ($r=-0,389$, $P=0,003$), мочевины ($r=-0,267$, $P=0,026$), тромбоцитов ($r=-0,379$, $P<0,0001$); и лейкоцитов ($r=-0,382$, $P<0,0001$).

Значение ИЛ-17 имеет отрицательную статистически значимую связь со значениями АЛТ и АСТ ($r=-0,209$, $P=0,021$ и $r=-0,249$, $P=0,006$).

Уровень TGF β 1 в крови пациентов имеет положительную статистически значимую связь с показателями АЛТ ($r=0,221$, $P=0,014$), АСТ ($r=0,263$, $P=0,004$), альбумином ($r=0,600$, $P=0,004$), общим белком плазмы ($r=0,296$, $P=0,027$), уровнями ФНО α ($r=0,897$, $P<0,0001$), ИЛ-10 ($r=0,656$, $P<0,0001$), и отрицательную с

уровнем ИЛ-17 ($r=-0,677$, $P<0,0001$) и креатинином ($r=0,354$, $P=0,014$)

Патогенез вирусного гепатита дельта до конца не известен [3]. Показано, что гепатит Д во многом иммуно-опосредованный процесс. Вирус гепатита дельта способен подавлять сигналинг интерферона- α , вызывать резкий подъем АСТ, и вызывать выработку, так называемых перфорин-экспрессирующих лимфоидных клеток, включая CD4+, которые встречаются достоверно чаще, чем при моноинфекциях HBV и HCV. Данная субпопуляция лимфоцитов способна к выработке протеина IP10, ИНФ γ , ИЛ-2 и небольшой уровень ИЛ-10 [6].

Однако существуют исследования, которые указывают на то, что в развитии HDV-инфекции имеет значение также цитопатическое действие. Ключевыми сигнальными молекулами прогрессирования цирроза и некрозо-воспалительных изменений печени и канцерогенеза являются провоспалительные цитокины (ИЛ-18, ИЛ-10, ИЛ-4), трансформирующие факторы роста и другие [5]. Известно, что Т-хелперы (Th) играют важную роль в иммуномодуляции. Синтез и уровень провоспалительных цитокинов связаны с активацией Т-хелперов (Th) определенного профиля: Th-1, Th-2 или Th-17 типа, которые определяют соответствующий цитокиновый статус и тип иммунного ответа. Основные цитокины, включая интерлейкин 2 (IL-2) и интерферон-гамма (IFN- γ), секретируются клетками Th1. Th1 цитокины связаны с клеточно-опосредованным иммунитетом для борьбы с внутриклеточными патогенами, такими как вирусы, и участвуют в пролиферации и активации цитотоксических Т-лимфоцитов и активации натуральных киллерных клеток. Основными лимфокинами, секретируемыми клетками Th2, являются интерлейкин 4 (IL-4) и интерлейкин 10 (IL-10). Цитокины из Th1-клеток ингибируют Th2-клетки и наоборот. Активация Th17 типа опосредует запуск аутоиммунного воспаления.

Повышение ФНО-альфа ($P=0,009$), интерлейкина-10 ($P=0,002$) в зависимости от стадии фиброза свидетельствуют с одной стороны об активности провоспалительного ответа при прогрессировании гепатита D, с другой стороны об одновременном увеличении активности противовоспалительных цитокинов. Наличие корреляционной связи TGF β 1 – профибротического фактора с уровнем ИЛ-10 подтверждает роль данного противовоспалительного цитокина в прогрессировании фиброза печени при HDV-инфекции. Отрицательная корреляционная связь уровня ИЛ-17 с

TGF β 1 позволяет сделать выводы о вовлеченности аутоиммунного компонента в при хронической HDV-инфекции.

Выводы

Прогрессирование фиброза при вирусном гепатите В с дельта-агентом ассоциируется с активностью уровня ФНО α и уровня интерлейкина-10, которые в свою очередь имеют отрицательную связь с интерлейкином-17 и положительную связь с TGF β 1. Повышение уровня ИЛ12/23 у всех пациентов с гепатитом Д и наличие отрицательной корреляции ИЛ-17 с TGF β 1 свидетельствует о запуске аутоиммунного воспаления на начальных стадиях фиброза при HDV инфекции и снижении его активности по мере прогрессирования фиброза в цирроз, а также снижении активности CD4 и возможно вследствие снижения количества CD4 вследствие цитопатогенного действия вируса, прогрессирования гиперспленизма.

Дальнейшее исследование полиморфизма генов ИЛ-10, TGF β 1 и ИЛ17 позволит расширить представление о факторах прогрессирования HDV-инфекции в цирроз и первичный рак печени.

Литература

1. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers [Text] / [M. Rizzetto et al.] // Gut. - 1977. - №18. - P. 997-1003.
2. Freitas, N. Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles [Text] / N. Freitas, C. Cunha, S. Menne // J Virol. - 2014. - Vol.88(10). - P. 5742-54.
3. H. Wedemeyer, M.P. Manns // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology - 2010. - №7. - P.31-40.
4. Correlation between TH1 response standard cytokines as biomarkers in patients with the delta virus in the western Brazilian Amazon [Text] / [L.D. Nicolette et al.] // Mem Inst Oswaldo Cruz. - 2016. - Vol. 111(4). - P. 275-276.
5. Long term outcome of hepatitis delta: A 14-year single center experience [Text] / [B.Calle Serrano et al.] // Hepatology. - 2009. - Vol.50. - P.737A.
6. Boyman, O. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system [Text] / O. Boyman // J Nat Rev Immunol. - 2012. - Vol. 12(3). - P. 180-90.
7. Distinct HLA class II alleles determine antibody response to vaccination with hepatitis B surface antigen [Text] / [S. Caillat-Zucman et al.] // Kidney Int. - 1998. - Vol. 53(6). - P. 1626-30.
8. Grabowski J. Hepatitis delta: immunopathogenesis and clinical challenges [Text] / J. Grabowski // Dig Dis. - 2010. - Vol. 28(1). - P. 133-8.