

АНАЛИЗ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ И ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Исследование направлено на анализ цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-10, ИЛ-17А у больных циррозом печени вирусной этиологии и хроническим вирусным гепатитом. Всего в исследовании приняло участие 211 человек. Из них 65 с диагнозом цирроз печени вирусной этиологии, 57 с хроническим вирусным гепатитом и 89 человек контрольной группы. Определение цитокинов проводили методом иммуноферментного анализа. В проведенном нами исследовании установлено, что у больных хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени отмечается гипопродукция провоспалительного цитокина ИЛ-17А по сравнению с контрольной группой. Так же гипопродукция цитокина ИЛ-1 β у больных хроническим вирусным гепатитом по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит; цирроз печени; цитокиновый статус

Введение. Вирусные гепатиты являются важной социальной и медицинской проблемой. Наибольшую опасность представляют парентеральные вирусные гепатиты В и С вследствие высокой степени хронизации и вероятностью перехода процесса в конечные стадии – цирроз печени или гепатоцеллюлярную карциному [1,2]. Исходы хронических вирусных гепатитов зависят от иммунного ответа [3]. Цитокины являются ключевыми медиаторами воспалительного процесса и формирования специфического иммунитета, ответственного за естественную элиминацию вируса гепатита [4]. У больных хроническим вирусным гепатитом (ХВГ) отмечается взаимосвязь с соотношением цитокинов. В отечественных и зарубежных исследованиях показана роль цитокинов в контроле вирусной репликации [5], процессов повреждений гепатоцитов и воспалительной инфильтрации [6], регенерации и развитие фиброза печени [7]. Вирусы гепатита В и С инфицируют не только гепатоциты, но и другие клетки-мишени, в частности клетки иммунной системы — лимфоциты, что приводит к угнетению их функциональных возможностей и длительной персистенции вируса в организме [8]. Установлено, что инфицирование вирусами гепатита приводит к активации Т-хелперов 1-го и 2-го типов (Th-1, Th-2), соотношение которых, на ранних стадиях может определять исход заболевания [9]. Так же учеными установлено, что при прогрессировании хронического вирусного гепатита в цирроз печени, повышается уровень противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) и снижается уровень провоспалительных (ИЛ-1В, ИЛ-17А) [10].

К одним из представителей провоспалительных цитокинов относится интерлейкин 1 β (ИЛ-1В). ИЛ-1 регулирует процессы воспаления и иммунитета [11]. Он синтезируется многими клетками организма, в первую очередь активированными макрофагами, в меньшей степени кератиноцитами, стимулированными В-лимфоцитами и фибробластами [12]. Клетками-мишенями действия ИЛ-1 являются миоциты, синовиоциты, гепатоциты, костные клетки, лимфоциты, нейрциты [13]. Доказано, что большую роль в развитии заболеваний печени играет ИЛ-1 [14]. Все провоспалительные цитокины являются взаимными индукторами: ИЛ-1 усиливает продукцию самого ИЛ-1, а также интерлейкинов 6, 8 и ФНО- α . Последний, в свою очередь, индуцирует синтез интерлейкинов 1, 6 и 8 [15].

Интерлейкин-17 (ИЛ-17) так же относится к семейству провоспалительных цитокинов, продуцируемых Т-хелперами 17 (Th17) [16], и играет важную роль в заболеваниях, ассоциированных с воспалением [17]. Th17-клетки вовлекаются в иммунный ответ при бактериальном заражении, а также патогенетически связаны с развитием хронических воспалительных процессов [18]. Как показывают последние исследования, Th17-клетки ассоциированы с хроническими заболеваниями печени [19], в том числе с хроническим вирусным гепатитом В, циррозом печени и гепатоцеллюлярной карциномой [20]. Было показано, что увеличение частоты встречаемости Th17-клеток в периферической крови и печени пациентов при хроническом вирусном гепатите В связано с повышением уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) [21].

Противовоспалительный цитокин интерлейкин-10 (ИЛ-10) играет важную роль в регуляции иммунного ответа, угнетает действие макрофагов и Th1-клеток и, соответственно, уменьшает цитотоксический ответ организма, а также способствует реализации биологических эффектов Th2-клеток, что обеспечивает развитие гуморальной составляющей иммунного ответа [22]. Отмечается увеличение концентрации ИЛ-10 при различных опухолях, при этом, высокая продукция ИЛ-10 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и выраженной прогрессией опухолевого роста [23].

Цель исследования. Анализ уровня цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-10, ИЛ-17А у больных циррозом печени вирусной этиологии и хроническим вирусным гепатитом.

Материалы и методы. В исследовании случай-контроль [24, 25], всего приняло участие 211 человек, в возрасте от 18 до 80 лет. Из них 65 пациентов с ЦП вирусной этиологии и 57 с ХВГ, состояли на учете в Гепатологическом центре г. Семей с установленным и подтвержденным диагнозом. В контрольной группе 89 донора, HBV- и HCV-отрицательны. Половозрастные характеристики приведены в таблице 1. Обследование на наличие или отсутствие хронического вирусного гепатита проводили согласно Приказу и. о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 17 февраля 2012 года № 92 «Об утверждении Правил обследования и лечения больных вирусными гепатитами».

Таблица 1 – Распределение больных циррозом печени вирусной этиологии, хроническим вирусным гепатитом и контрольной группы по полу и возрасту

Показатель	Пациенты с циррозом печени вирусной этиологии (n=65)	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом (n=57)	Контрольная группа (здоровые лица) (n=89)
Пол (муж/жен)	33/32	28/29	29/60
Возраст: интервал средний	29 – 75 50,8±10,7	18 - 79 41,6±13,0	18 - 79 40,1±12,3

Исследование отвечает требованиям Хельсинской декларации, Всемирной Медицинской Ассоциации (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>) и одобрено этическим комитетом Государственного Медицинского Университета г. Семей, протокол №2 от 13.11.2013г. Все участники исследования были информированы о целях исследования и предстоящих процедурах, у всех было получено информированное письменное согласие на участие в исследовании.

Для исследования использовалась периферическая кровь в 5 мл пробирки с ЭДТА. Определение цитокинов методом твердофазного ИФА проводилось на базе Объединенной учебно-научной лаборатории Государственного медицинского университета г. Семей: ИЛ-1В, ИЛ-10, ИЛ-17. Исследование цитокинов проводилось методом иммуноферментного определения концентрации интерлейкинов при помощи коммерческой тест-системы «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) с использованием иммуноферментного анализатора ПИКОН (PICON Incorporated Co, Россия) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Для анализа количественных признаков [24] при сравнении двух независимых выборок применяли непараметрический критерий Манна-Уитни [26], при сравнении трех и более выборок — H-критерий Краскеля-Уоллеса [27], предварительно проверив на нормальность распределения выборки с помощью критерия Шапиро-Уилка. Различия между выборками считались статистически достоверными при значении для $p < 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием программы SPSS для Windows, версии 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Результаты исследования. Сравнение трех групп по возрасту выявило статистически значимую разницу. Возраст пациентов с циррозом печени был значимо старше (50,8±10,7), чем пациентов с хроническим вирусным гепатитом (41,6±13,0 лет) и здоровых лиц (40,1±12,3 лет). Значимой разницы в возрасте между двумя последними группами не наблюдалось. Эти результаты, вероятно, указывают на то, что прогрессия вирусного гепатита к циррозу печени растягивается во времени; в данном исследовании этот срок оказался равным около 9 годам.

Средний уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 был снижен у больных циррозом печени вирусной этиологии, однако этот результат не достиг статистической значимости (таблица 2).

Таблица 2 – Сравнение уровня цитокина ИЛ-10

Критерии	ЦП (n = 65)	ХВГ (n = 57)	Контроль (n = 89)
ИЛ-10	Me = 5,900 Q1 = 3,452 Q3 = 10,305	Me = 6,280 Q1 = 3,095 Q3 = 8,262	Me = 7,100 Q1 = 3,586 Q3 = 13,757
Критерии Краскеля - Уоллеса	H = 3,253; df* = 2; p** = 0,197		
Критерии Манна - Уитни	Сравнение: ЦП и контроль	U = 2588; Z = -1,114; p = 0,265	
	Сравнение: ХВГ и контроль	U = 2089; Z = -1,793; p = 0,073	

* df – число степеней свободы

**p – достигнутый уровень статистической значимости

Содержание уровня ИЛ-1В, в значительной степени снижено у больных хроническим вирусным гепатитом в сравнении с контрольной группой, и достиг статистической значимости. При сравнении цирроза печени и здоровых лиц, статистических значимых различий в содержании уровня ИЛ-1В нет.

Таблица 3 – Сравнение уровня цитокина ИЛ-1В

Критерии	ЦП (n=65)	ХВГ (n=57)	Контроль (n=89)
ИЛ-1В	Me=5,113 Q1=1,592 Q3=9,765	Me=1,800 Q1=1,300 Q3=4,841	Me=4,091 Q1=2,045 Q3=9,814
Критерии Краскеля -	H = 10,277; df = 2; p = 0,006		

Уоллеса		
Критерии Манна - Уитни	Сравнение: ЦП и контроль	U = 2756; Z = -0,338; p = 0,735
	Сравнение: ХВГ и контроль	U = 1795; Z = -2,975; p = 0,003

Нами были выявлены статистически значимые различия по содержанию уровня ИЛ-17А у больных циррозом печени вирусной этиологии и у больных хронически вирусным гепатитом в сравнении с контрольной группой как показано в таблице 4.

Таблица 4 – Сравнение уровня цитокина ИЛ-17А

Критерии	ЦП (n = 65)	ХВГ (n = 57)	Контроль (n = 89)
ИЛ-17А	Me=1,600 Q1=0,400 Q3=3,000	Me=1,600 Q1=0,650 Q3=2,550	Me=3,500 Q1=0,800 Q3=6,671
Критерии Краскеля - Уоллеса	H = 16,738; df = 2; p = 0,001		
Критерии Манна - Уитни	Сравнение: ЦП и контроль	U = 1963; Z = -3,400; p = 0,001	
	Сравнение: ХВГ и контроль	U = 1677; Z = -3,447; p = 0,001	

Обсуждение. В проведенном нами исследовании мы получили снижение уровня цитокина ИЛ-17А у больных хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени вирусной этиологии в сравнении с контрольной группой. По данным полученным нами при литературном поиске, было обнаружено увеличение уровня ИЛ-17А при хроническом вирусном гепатите В [28,29], и снижение при хроническом вирусном гепатите С [30]. В нашем исследовании мы объединили хронические вирусные гепатиты В и С в общую группу в виду схожести патогенеза хронических вирусных гепатитов, не разделяя на отдельные нозологии.

Установлено, что при прогрессировании хронического вирусного гепатита в цирроз печени, повышается уровень провоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) и снижается уровень противовоспалительных (ИЛ-1В, ИЛ-17А) [31]. Mohammad Kazemi A и соавт., установили, что уровень ИЛ-10 повышается у больных хроническими вирусными гепатитами [28] и снижается у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой вирусной этиологии [32]. В нашем исследовании уровень интерлейкина -10 снижен у больных ХВГ и повышен у больных ЦП по сравнению с контрольной группой, однако статистически достоверной разницы во всех исследуемых группах не было. Это возможно связано с относительно малой выборкой, что дает возможность для продолжения исследований в данном направлении с большим количеством обследуемых.

Содержание уровня цитокина ИЛ-1β статистически достоверно снижено у больных ХВГ в сравнении с контрольной группой, и незначительно повышен у больных циррозом печени, однако статистической значимости этот результат не достиг. Это может так же означать, что провоспалительный цитокин ИЛ-1β может влиять на течение болезни у наших больных, снижается при хроническом вирусном гепатите и повышается при прогрессировании в цирроз печени. Е.Л. Красавцев, в исследовании [33] показал, что уровень ИЛ-1β повышается по мере прогрессирования хронического вирусного гепатита, что так же подтверждает нашу теорию.

Вывод. В проведенном нами исследовании установлено, что у больных хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени отмечается гипопродукция провоспалительного цитокина ИЛ-17А по сравнению с контрольной группой, так же гипопродукция цитокина ИЛ-1β у больных ХВГ по сравнению с контрольной группой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Papatheodoridis G. V. et al. Barriers to care and treatment for patients with chronic viral hepatitis in Europe: a systematic review. //Liver International. – 2014. – 34 – №. 10. – P. 1452-1463.
- 2 Lazarus J. Global policy report on the prevention and control of viral hepatitis in WHO Member States. //World Health Organization, 2014.
- 3 Арсентьева Н. А., Семенов А. В., Тотолян А. А. Роль полиморфизма генов цитокинов при вирусном гепатите С. //Инфекция и иммунитет. – 2012. – 2 – С. 687-698.
- 4 Семенов А. В., Арег А., Арсентьева Н. А. Роль полиморфизма генов цитокинов при вирусном гепатите С //Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2. – №. 4.
- 5 Маркелова Е. В., и др. Патогенетическая роль нарушений в системе цитокинов при инфекционно-воспалительных заболеваниях //Тихоокеанский медицинский журнал. – 2008. – Т. 3. – С. 24-9.
- 6 Симбирцев А. С. Цитокины: классификация и биологические функции //Журнал Цитокины и воспаление. – 2004. – №. 2. С. 5-6.
- 7 Симбирцев А. С. Цитокиновая система регуляции защитных реакций организма //Журнал Цитокины и воспаление. – 2002 – №. 1. С. 3-5.
- 8 Мирхайдаров Р. Ш. и др. Особенности иммунного статуса больных хроническим вирусным гепатитом. //Геронтология. – 2015. – Т. 7. – С. 26..

- 9 Белобородова Э. И., Пузырев В. П. Анализ связи полиморфизма IL50VAL гена рецептора интерлейкина-4 (IL4RA) с хроническим вирусным гепатитом. //Молекулярная биология. – 2005. – Т. 39. – №. 3.
- 10 Wang J, Ni H, Chen L, Song WQ. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with hepatitis B virus infection or hepatocellular carcinoma in Chinese Han ethnic population. //Hepatobiliary Pancreat Dis Int. – 2006. – 5(60). P. 4.
- 11 Громова А. Ю., и др. Влияние функционального полиморфизма генов семейства интерлейкина-1 на предрасположенности и характер течения хронического гнойного риносинусита и эффективность терапии рекомбинантным интерлейкином-1 бета (беталейкин). //Российская оториноларингология. //Медицинский научно-практический журнал. – 2005. – 2 – С. 5–12.
- 12 Романова Е. С., Кузнецов Н. И., Старцева Г. Ю. Беталейкин В терапии хронического гепатита С. //Журнал инфектологии. – С. 27.
- 13 Саламатов А. В., и др. Эффективность рекомбинантного IL-1 бета в лечении гнойно-деструктивных заболеваний легких и плевры //Цитокины и воспаление. – 2006. – 5 – С. 39– 45.
- 14 Кляритская И. Л., Стилиди Е. И. Роль различных цитокинов в фиброгенезе печени при хронических вирусных гепатитах В и С. //Кримский терапевтический журнал. – 2010. – №. 1. – С. 41-45.
- 15 Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Цитокины — общая система гомеостатической регуляции клеточных функций //Цитология.— 2001.— № 12.— С. 1101—1110.
- 16 Nordang G. B., Viken M. K., et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. //Rheumatology (Oxford). — 2009. — 48 — P. 367-370.
- 17 Omrane I. et al. Significant association between interleukin-17A polymorphism and colorectal cancer. //Tumor Biology. — 2014. — 35(7) — P. 6627-6632.
- 18 Кологривова И. В., Кологривова Е. Н., Суслова Т. Е. Молекулярные аспекты функционирования Т-хелперов 17-го типа. //Бюллетень сибирской медицины. — 2011. — 4 — P. 93-99.
- 19 Zhang J. Y. et al. Interleukin-17-producing CD4+ T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. //Hepatology. — 2010. — 51(1) — P. 81-91.
- 20 Hu X. et al. Interleukin-21 is upregulated in hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure and associated with severity of liver disease. //Journal of viral hepatitis. — 2011. — 18(7) — P. 458-467.
- 21 Wang X. et al. High-mobility group box 1 (HMGB1) -toll-like receptor (TLR) 4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: Interaction of $\gamma\delta$ T cells with macrophages. //Hepatology. — 2013. — 57(1) — P. 373-384.
- 22 Масабаева М. Р., Аукиенов Н. Е., Бабенко Д. Б., Азизов И. С., и др. Оценка влияния полиморфизма гена *IL10* на исходы хронических вирусных гепатитовв казахской популяции: исследование случай-контроль. //Наука и Здравоохранение. — 2015. — № 6 — С. 67-76.
- 23 Wang, S., Huang, D., Sun, S., Ma, W., & Zhen, Q. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis B to interferon alpha. //Virology journal. — 2011 — 8.(28) — P. 422.
- 24 Бекенова Н. Б., Гржибовский А. М., Муковозова Л. А. Содержание цитокинов у больных рожей //Наука и Здравоохранение. — 2015. — № 6 — С. 55-66.
- 25 Гржибовский А. М. Иванов С. В., Горбатова М. А. Исследования типа «случай-контроль» в здравоохранении //Наука и Здравоохранение. — 2015. — № 4 — С. 5-17.
- 26 Гржибовский А. М. Анализ количественных данных для двух независимых групп // Экология человека. 2008. № 2. С. 54-61.
- 27 Гржибовский А. М. Анализ трех и более независимых групп количественных данных // Экология человека. 2008. №. 3. С. 50-58.
- 28 Mohammad Kazemi A. et al. Serum levels of IL-10 and IL-17A in occult HBV-infected South-East Iranian patients //Hepatitis Monthly. – 2010. –№. 1, Winter. – P. 31-35.
- 29 Wu W. et al. Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients //Journal of gastroenterology and hepatology. – 2010. – 25. – №. 4. – P. 750-757.
- 30 Sousa G. M. et al. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection //Cytokine. – 2012. – Т. 60. – №. 1. – P. 138-142.
- 31 Wang J, Ni H, Chen L, Song WQ. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with hepatitis B virus infection or hepatocellular carcinoma in Chinese Han ethnic population. //Hepatobiliary Pancreat Dis Int. – 2006 – 5 – P. 60-64.
- 32 Saxena R, Chawla YK, Verma I, Kaur J. Association of interleukin-10 with hepatitis B virus (HBV) mediated disease progression in Indian population. //Indian J Med Res. – 2014. – 139 – P. 737-745.
- 33 Красавцев Е. Л. Динамика уровня цитокинов у больных хроническим гепатитом С. //Проблемы здоровья и экологии. – 2009. – №. 2 (20) – С. 2-4.

М.Р. МАСАБАЕВА, Н.Е. АУКЕНОВ

Семей қ. мемлекеттік медициналық уәливерситеті, Қазақстан

**ВИРУСТЫ ЭТИОЛОГИЯЛЫҚ БАУЫР ЦИРРОЗЫ ЖӘНЕ СОЗЫЛМАЛЫ ВИРУСТЫ ГЕПАТИТИ БАР НАУҚАСТАРДА
ЦИТОКИНДЕРДІ ТАЛДАУ**

Түйін: Зерттеу вирусты этиологиялық бауыр циррозы және созылмалы вирусты гепатиті бар науқастарда ИЛ-1 β , ИЛ -10, ИЛ -17А цитокиндерін талдауға бағытталған. Зерттеуге барлығы 211 адам қатысқан. Оның ішінде вирусты этиологиялық бауыр циррозымен - 65, созылмалы вирусты гепатитпен - 57 және бақылау топта - 89 адам. Цитокиндерді анықтау иммуноферменттік әдіспен жүзеге асты. Өткізілген зерттеу барысында бақылау тобымен салыстырғанда бауырдың созылмалы вирусты гепатиті және бауыр циррозы бар науқастарда ИЛ-17А цитокинінің қабыну гипопродукциясы анықталды. Сонымен қатар бақылау тобымен салыстырғанда созылмалы вирусты гепатит бар науқастарда Ил-1 β цитокиндердің гипопродукциясы байқалды.

Түйінді сөздер: созылмалы вирусты гепатит; бауыр циррозы; цитокиндік статус.

M.M. MASSABAYEVA, N.E. AUKENOV

State medical university of Semey, Kazakhstan

**ANALYSIS OF CYTOKINE STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS AND VIRAL
ETIOLOGY CIRRHOSIS OF THE LIVER**

Resume: The study is aimed to analyze cytokines IL-1 β , IL-10, IL-17A in patients with liver cirrhosis of viral etiology and chronic viral hepatitis. A total 211 people involved in the study. 65 of them are diagnosed with liver cirrhosis of viral etiology, 57 with chronic viral hepatitis and 89 in the control group. Determination of cytokines was performed by ALISA. In the current study was determined that in patients with chronic viral hepatitis and cirrhosis of the liver marked hypoproduction of pro-inflammatory cytokine IL-17A compared with the control group. In the same way hypoproduction of cytokine IL-1 β in patients with chronic viral hepatitis compared with the control group.

Keywords: chronic viral hepatitis; liver cirrhosis; cytokine status.