

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ИНТЕРЛЕЙКИНЫ И ИХ РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКИХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В И С У ДЕТЕЙ

Раба Т.И. Email: Raba627@scientifictext.ru

*Раба Татьяна Ивановна – кандидат медицинских наук, доцент,
Департамент педиатрии,
Государственный медицинский и фармацевтический университет им. Николае Тестемицану,
г. Кишинев, Республика Молдова*

Аннотация: в статье представлены результаты исследования уровня провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6 и TNF-α в крови у 56 детей с ХВГВ (33) и ХВГС (23) в возрасте 3-18 лет и их роль в патогенезе. Выявлена высокая концентрация цитокина IL-2 и незначительная IL-6 в крови у обследуемых детей, которая коррелирует с активностью воспалительного процесса в печени и не зависит от вiremии. Незначительное увеличение IL-6 и нормальная концентрация TNF-α в крови предполагает недостаточность ответных защитных иммунных реакций у детей с ХВГВ и ХВГС и определяет отсутствие агрессивного характера течения заболевания. Полученные нами результаты подтверждают важную диагностическую и прогностическую роль провоспалительных цитокинов в патогенезе хронических вирусных гепатитов В и С у детей.

Ключевые слова: цитокины, дети, гепатит, хронические гепатиты В, С.

PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND THEIR ROLE IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC HEPATITIS B AND C IN CHILDREN

Raba T.I. Email: Raba627@scientifictext.ru

*Raba Tatiana Ivanovna - PhD, assistant professor,
DEPARTMENT OF PAEDIATRICS,
STATE UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY NICOLAE TESTEMITANU,
KISHINEV, REPUBLIC OF MOLDOVA*

Abstract: the author presented in the article results of the study of proinflammatory cytokines levels – IL-2, IL-6 and TNF-α, in a group of 56 children with chronic hepatitis B infection (33) and chronic hepatitis C infection (23), aged 3 to 18 years, and the role of these cytokines in the pathogenesis. High IL-2 levels and low IL-6 levels were found in the sera of studied children, that correlates with hepatic inflammatory activity and does not depend on viremia levels. Unsignificant increase of IL-6 level and normal TNF-α level in the blood indicate insufficient immune response in children with chronic hepatitis B and C infections, and determines slow progression of the disease. Our results confirm an important diagnostic and prognostic role of the proinflammatory cytokines in the pathogenesis of chronic hepatitis B and C in children.

Keywords: cytokines, children, hepatitis, chronic hepatitis B infection, chronic hepatitis C infection.

УДК 616.36-002.2

Патогенетические механизмы и факторы, способствующие хроническому течению вирусной В и С инфекций у детей, на протяжении многих лет являются предметом множественных научных исследований [2, 3]. Цитокины являются важными медиаторами между специфическим и неспецифическим, гуморальным и клеточным иммунитетом, обеспечивая ответные защитные реакции организма на воспалительный процесс [1, 4, 8]. В процессе формирования хронических вирусных гепатитов В и С важную роль имеют и такие факторы как путь инфицирования, возраст, антигенные свойства возбудителя и его возможности адаптации [2, 3]. При парентеральном механизме инфицирования ВГВ активная репликация начинается только спустя 4 - 5 недель после проникновения возбудителя в клетки печени [3, 7]. Для течения ХВГВ у детей характерно преобладание фазы иммунной активности [1]. Важной особенностью ВГВ является способность интегрироваться в геном человека и вызывать изменение последовательности нуклеотидов и нарушение экспрессии антигена с формированием HBsAg-негативных форм ХВГВ [3, 5]. Значительную роль в патогенезе вирусной HB-инфекции имеет и способность возбудителя вызывать мутации в S-регионе или пре-S-регионе, тем самым модифицируя свою антигенность и подавляя синтез antiHBs, создавать себе условия для ускользания от иммунного контроля организма [2, 3]. Эта варибельность ВГВ определяет развитие субклинических, стертых и трудных в диагностике «оккультных» форм ХВГВ редко встречающихся у детей [2, 6].

В патогенезе ХВГС, в отличие от ХВГВ, основная роль принадлежит прямому цитопатическому действию ВГС и непосредственной репликации вируса до миллиардов копий в сутки сразу после его внедрения в гепатоцит [2, 3]. Существует мнение, что при ХВГС важную роль в элиминации вируса из

организма играют ответные клеточные иммунные реакции между антиген-специфическими Т-хелпер 1 (CD4+) и цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD8+) [2,3]. Ответные защитные иммунные реакции организма имеют опосредованную роль в повреждение инфицированных гепатоцитов ВГС и обеспечиваются действием цитотоксических Т-лимфоцитов и перекрестными аутоиммунными реакциями [2, 4]. Для длительной персистирующей репликации ВГС большое значение имеет его вариабельность и его низкая иммуногенность [2, 3]. Изменяя непрерывно свою антигенную структуру, ВГС уходит от иммунного контроля организма, репродуцируя себя интенсивно [2, 3].

В процессе распознавания ВГВ или ВГС и подавления репликации, важную роль имеют провоспалительные цитокины - интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), которые способствуют регуляции равновесия субпопуляций Т-лимфоцитов, их активации, дифференциации эффекторных клеток и синтезе противовоспалительных цитокинов [4,7]. Активация провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6, TNF- α начинается с момента активной репликации ВГВ или ВГС и нарастания титра вирусии [2, 3]. По своей функциональной активности цитокины разделяют на провоспалительные (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ) и противовоспалительные (IL-4, IL-10) [7,8]. Посредством цитокинов лимфоциты Т-хелперы распознают возбудитель и стимулируют активацию лимфоцитов Т-киллеров для уничтожения инфицированных клеток, а лимфоциты Т-супрессоры способствуют подавлению этого процесса [9].

Основной синтез IL-2 осуществляется лимфоцитами Т-хелпер, цитотоксическими Т-клетками до 20% и может стимулироваться и другими биологически активными веществами как IL-1, IL-6, TNF [8]. Провоспалительный цитокин IL-2 является основным пусковым патогенетическим фактором специфического и неспецифического иммунного ответа на патологичные антигены, способствует активации рецепторов к IL-2, расположенных на Т-лимфоцитах, влияет на созревание В-лимфоцитов, стимулирует образование гепатоцитами белков острой фазы заболевания, усиливает функции нейтрофилов, NK и обеспечивает взаимосвязь между иммунной, нервной и эндокринной системами [7, 8]. IL-6 относится к группе провоспалительных цитокинов, синтезируется макрофагами, Т и В лимфоцитами, обеспечивает пролиферацию клеток тимуса, В-лимфоцитов, предшественников цитотоксических лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов, а также продукцию гепатоцитами белков острой фазы воспаления [7, 8]. TNF- α продуцируется макрофагами, тучными клетками и Т- и В-лимфоцитами и относится к лимфотоксинам, воздействует в воротах проникновения возбудителя и индуцирует синтез белков острой фазы воспаления и апоптоз [2, 3, 8]. Данный цитокин вырабатывается макрофагами, тучными клетками и Т- и В- лимфоцитами [7, 8].

Регулирование и контроль уровня провоспалительных цитокинов в крови осуществляется цитокинами IL-4, IL-13, IL-10 [7,8]. Доказано что лимфоциты Т-хелперы 1 (Th1) посредством IL-2 способствуют активации цитотоксических лимфоцитов Т супрессоров (CD8+) и усиливают синтез интерферона- γ (INF- γ), IL-2, TNF- α) [2, 3, 4]. Активация лимфоцитов Т-хелперов 2 (Th2) стимулирует гуморальное звено иммунитета, способствуя созреванию В-лимфоцитов и синтезу противовоспалительных цитокинов [3, 8]. Активирование системы иммунного ответа по Th1- типу способствует выведению вируса из организма, а по Th2 - типу - персистированию инфекции [2, 8]. Исследования последних лет доказали присутствие дефицита лимфоцитов Т-хелпер (Th1 и Th2) CD4+ в крови больных с ХВГС [2, 3]. Это может привести к нарушению синтеза провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, их инактивации и цитокинового равновесия и формированию хронического воспаления [7, 8].

Цель исследования: при хронических гепатитах вирусной этиологии В и С у детей изучить содержание в крови провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6 и TNF- α в зависимости от активности хронического вирусного воспалительного процесса в печени.

Материалы и методы: у 56 детей с ХВГВ (33) и ХВГС (23) в возрасте 3-18 лет было исследовано содержание в крови провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6 и TNF- α . Контрольную группу составили 21 «соматически здоровых» детей в возрасте 4-18 лет. Диагноз ХВГВ и ХВГС был установлен в соответствии с международными и национальными рекомендациями [9,10]. Комплекс изучаемых методов включал сбор анамнеза, осмотр пациента, вирусологическое исследование маркеров ВГВ, ВГС, ADN VHB, ARN VHC и его генотип, ARN VHD (PCR методом Real Time). По клиническим показаниям была проведена магнитно-резонансная абдоминальная томография (МРТ). Исследование генотипа ВГВ не проводили. Степень фиброза печени обследовали у детей старше 5 лет с весом более 20 кг методом эластографии (FibroScan 502, аппарат Echosens, Франция). В 6 случаях была проведена биопсия печени (применена игла Menghini, пункция проводилась под общим наркозом, автор исполнитель) с гистологическим исследованием биоптата. Определение IL-2, IL-6, TNF- α в крови было выполнено в лаборатории иммунологии клинической базы с использованием иммуноферментных тест-систем (производитель «Вектор-Бест», Россия). Участие пациента в исследовании было подтверждено письменным согласием родителей. Проект научного исследования был одобрен 14.09.15 Комитетом Этики исследования ГМФУ им. Николае Тестемицану, Республики Молдова. Статистический анализ был

проведен с помощью StatSoft Statistica версия 6,0 ru. с определением критерия t-Student, точного критерия Fisher и критерия хи-квадрат. Случаи с $p \leq 0.05$ были определены как статистически значимые.

Результаты и обсуждение

Средний возраст детей с ХВГВ (33) и ХВГС (23) был 12 лет, а в контрольной группе – 11 лет, с преобладанием мальчиков. У 18% детей с ХВГВ заболевание сочеталось с дельта инфекцией. Среди детей с ХВГВ выраженный фиброз печени F3 был констатирован у 3 (21%), F2 – у 2 (15%), а F0-F1 - у 9 (64%) детей. У больных с ХВГС преобладал генотип 1в в 96% и только у одного ребенка был выявлен генотип 3а. По стадии ХВГС характеризовался минимальным фиброзом F0-F1 – у 9 (64%), F2 – у 5 (36%) и отсутствием F3.

При ХВГВ и ХВГС течение заболевания проявлялось активностью воспалительного процесса у 57% больных. Увеличением фермента АЛАТ более чем 1,5 раза выявлено у 13 детей, в 3 раза – у 14 и только у 5 – значения превысили в 4-10 раз допустимые нормы. У 50% детей с ХВГВ преобладала иммуноактивная фаза с АДН VHB в пределах $>2000 - <10^9$ ui/ml и минимальный фиброз печени. Иммунотолерантной фазы с высоким уровнем вирусемии и АДН VHB в пределах $10^9 - 10^{12}$ ui/ml среди обследуемых больных с ХВГВ не было выявлено. У 6 детей с ХВГВ диагностирована дельта-инфекция с высоким уровнем вирусемии и АРН VHD в пределах $1,3 \times 10^8 - 1,4 \times 10^9$ ui/ml. Течение ХВГС характеризовалось низкой вирусной репликацией у 61% с АРН VHC $< 600\,000$ ui/ml и отсутствием или минимальным фиброзом печени. Анализ содержания провоспалительных цитокинов в крови выявило значительное и достоверное повышение уровня ИЛ-2 в крови, в сравнении с контрольной группой ($p_{1-3} < 0,05$; $p_{2-3} < 0,05$) у детей с ХВГВ и ХВГС (Таблица 1). Увеличение уровня ИЛ-6 у обследованных пациентов было выше среди детей с ХВГВ, по сравнению с детьми с ХВГС ($p_{1-3} < 0,05$). Учитывая что ИЛ-6 способствует дифференцированию Т-лимфоцитов в сторону Th 2 (CD4+), которые, как известно участвуют в подавлении иммунного ответа, диагностированная нами относительно низкая концентрация ИЛ-6 при ХВГС в сравнении с ХВГВ, возможно связан с минимальной степенью активности воспалительного процесса в печени. Незначительное, но достоверное повышение уровня ИЛ-6 и минимальный фиброз при ХВГС у обследованных вероятно обусловлен слабым иммунологическим ответом и низкой репликацией ВГС вследствие недостаточной дифференциации Т-лимфоцитов. Исследование уровня TNF- α в крови детей с ХВГВ и ХВГС не выявило достоверных изменений (Таблица 1). Это возможно имеет объяснение что TNF- α относится к цитокинам местного воздействия и активирует факторы острой фазы воспаления в момент внедрения возбудителя гематогенным путем, коррелируя с тяжестью заболевания при хорошем иммунном ответе.

Был проведен сравнительный анализ концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 и TNF- α в зависимости от степени активности воспалительного процесса ХВГВ и ХВГС и уровня вирусемии.

Таблица 1. Уровень цитокинов в крови детей с ХВГВ и ХВГС

Цитокины	1 группа ХВГВ (n=33)	2 группа ХВГС (n =23)	3 группа контрольная (n =21)	p
	M \pm m	M \pm m	M \pm m	
ИЛ-2, pg/ml	98 \pm 48	116 \pm 50	2 \pm 0,26	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
ИЛ-6, pg/ml	36 \pm 15	8 \pm 3,4	5 \pm 0,43	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
TNF- α , pg/ml	8 \pm 0,5	8 \pm 0,8	4 \pm 0,47	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$

Примечание: M \pm m - среднее значение и отклонение стандарт, p – статистическая значимость в группах. Статистические тесты: парный t- критерий Стьюдент; точный критерий Fisher.

Выявлена прямая и достоверная зависимость между показателями ИЛ-2 в крови и активностью воспалительного процесса: чем выше был цитолиз тем выше определялся уровень ИЛ-2 у детей с ХВГВ и ХВГС ($p < 0,05$). Показатели TNF- α в крови обследуемых больных были в пределах допустимых норм, а концентрация ИЛ-6 в крови детей с ХВГВ и ХВГС была незначительно повышена и не зависела от степени активности воспалительного процесса ($p > 0,05$). Учитывая, что у большинства исследуемых нами пациентов течение хронического вирусного процесса длительное, с умеренной вирусной репликацией и

преобладанием иммуноактивной фазы при ХВГВ и низкой вирусемии при ХВГС, можно предположить, что диагностическое значение IL-6 и TNF- α незначительно. Это подтверждает наличие нарушения равновесия в синтезе провоспалительных медиаторов и не исключает присутствие вторичного иммунодефицита у обследуемых детей.

Также был проведен анализ зависимости между уровнем IL-2, IL-6 и TNF- α в крови и степенью репликации ВГВ и ВГС. Концентрация IL-2 и IL-6 в крови достоверно была повышена у пациентов с ХВГВ и ADN VHB в пределах $> 2000 - 10^8$ ui/ml, в то время как для тех у кого ADN VHB менее 2000 ui/ml - отмечались более высокие значения ($p > 0,05$). Среди детей с ХВГС и ARN VHC $< 600\ 000$ ui/ml уровень IL-2 и IL-6 в крови значительно был выше, чем при вирусемии более 600 000 ui/ml ($p > 0,05$). Исследование концентрации TNF- α в крови у детей с ХВГВ и ХВГС не выявила зависимость от уровня вирусемии. Учитывая, что в нашем исследовании у 50% детей с ХВГВ преобладала иммуноактивная фаза, а у 61% с ХВГС – низкая репликация ВГС, отсутствие достоверной связи между уровнем IL-6 и TNF- α в крови и степенью вирусемии возможно имеет объяснение в сложных регуляторных механизмах взаимодействия различных факторов активации или угнетения продукции данных цитокинов. Созревание клеточных и гуморальных факторов врожденного и адаптированного иммунитета у детей происходит медленно, достигая совершенства к 6-7 годам [2, 8]. Инфицирование ВГВ или ВГС детей в раннем возрасте ведет к формированию частичного и недостаточного специфического иммунного ответа на внедрение возбудителя, который создает условия для длительного персистирования в организме.

Выводы. Полученные нами результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Провоспалительные цитокины IL-2, IL-6 и TNF- α имеют важное диагностическое и прогностическое значение в патогенезе ХВГВ и ХВГС у детей.
2. Высокое содержание IL-2 в крови детей с ХВГВ и ХВГС достоверно коррелирует с степенью активности хронического воспалительного процесса в печени и не имеет зависимость от уровня вирусемии.
3. Незначительное повышение уровня IL-6 и нормальная концентрация TNF- α в крови детей с ХВГВ в иммуноактивной фазе и ХВГС с низкой степенью вирусемии подтверждает недостаточность синтеза и ответных защитных иммунных реакций и нарушение регуляторных механизмов равновесия в системе медиаторов хронического вирусного воспаления.

Список литературы / References

1. *Зинович Я.И., Оскирко А.Н., Горегляд Н.С., Ключарева А.А.* Характеристика хронического гепатита В генотипа Д у детей // Актуальные вопросы инфекционной патологии: 6-й съезд инфекционистов Республики Беларусь, Витебск, 2014: ВГМУ. С. 81-82.
2. *Учайкин В.Ф., Чередниченко Т.В., Смирнов А.В.* Инфекционная гепатология // Москва. ГЭОТАР-Медиа, 2012. 640.стр.
3. *Пынтя В.* Острые и хронические вирусные гепатиты (этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение и профилактика) // Кишинев. Издательство Сириус, 2014. 259 стр.
4. *Луцашко Ю.* Хронические гепатиты и другие формы хронических диффузных заболеваний печени // Кишинев. Издательство Эрикон, 2014. Стр. 110-123.
5. *Думбрава В., Луцашко Ю., Цуркану А., Тофан-Скутару Л., Холбан Т., Спыну К.* Хронический гепатит и цирроз печени вирусной В и Д этиологии у взрослых // Национальный клинический протокол. Министерство Здравоохранения Республики Молдова. Кишинев, 2015. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.office@ms.gov.md>. (дата обращения: 08.02.2017).
6. *Panigrahi R., Biswas A., Datta S., Banerjee A., K Chandra P., K Mahapatra et al.* Anti-hepatitis B core antigen testing with defection and characterisation of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in Southeastern India: implications for transfusion. *Virology*, 2010. V. 7:204. [Electronic resource]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/> (дата обращения: 02.02.2017).
7. *Кетлинский С.А., Симбирцев А.С.* Цитокины // СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2008. 552 с.
8. *Калинина Н.М., Сосюкин А.Е., Вологжанин Д.А., Кузин А.А., Князев П.С.* // Журнал «Цитокины и воспаление», 2005. Т. 4. № 1. Стр. 28-35. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cytokines.ru/> (date of access: 02.02.2017).
9. European Association for Study of Liver. EASL. Recommendation on treatment of hepatitis C // *J Hepatology*, 2015. V. 63 (1). P. 199-236.
10. ESPGHAN. Clinical Practice Guidelines // Consensus of an expert panel on behalf of the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. // In: *Journal of Hepatology*, 2013. V. 59. P. 463-467.