

Влияние Бициклола на клеточный иммунный ответ у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В.

Shi Binbin, Peng Jie, Wen Fanyuan, Hou Jinlin,

Кафедра инфекционных болезней Южного Медицинского Университета, Гуанджоу.
Huizhou Municipal Central Hospital, Huizhou, Guangdong, 515600

Абстракт.

Цель. Изучить влияние Бициклола на уровни ИЛ-4, ИЛ-10 и ИФ- γ в культуре супернатантных мононуклеаров периферической крови (МПК) больных хроническим вирусным гепатитом В.

Методы. В исследовании принимали участие 30 больных хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ), в том числе 18 человек HBeAg (+), 12 человек - HBeAg (-). Все пациенты получали лечение Бициклолом в суточной дозе 150мг (по 50мг 3 раза) в течение 3 месяцев. Кровь исследуемых пациентов забиралась до начала лечения Бициклолом, затем через 1 и 3 месяца от начала приема. В качестве контрольной группы были отобраны 7 здоровых добровольцев.

Результаты. Исходные (базальные) уровни ИЛ-4 в культуре МПК пациентов ХГВ были достоверно выше, чем в контрольной группе [(17,18 \pm 7,43) пг/мл и (8,24 \pm 4,16)пг/мл, соответственно, $P < 0,05$], в то время как уровни ИФ- γ были достоверно ниже по сравнению с контрольной группой [(36,25 \pm 19,92) пг/мл против (121,68 \pm 44,40) пг/мл, $P < 0,01$].

Через 3 мес от начала лечения Бициклолом в лечебной группе отмечалось достоверное повышение уровня ИФ- γ [(53,19 \pm 7,28)] пг/мл против (36,25 \pm 19,92) пг/мл, $P < 0,05$], в то же время ИЛ-4 достоверно понизился по сравнению с исходным уровнем [(9,74 \pm 7,75) пг/мл против (17,18 \pm 7,43) пг/мл, $P < 0,01$]. Уменьшение ИЛ – 4 и повышение ИФ – γ на фоне приема Бициклола отмечалось у HBeAg (+) пациентов, причем оба показателя изменились достоверно по-сравнению с исходными данными ИЛ – 4 (8,74 \pm 6,12)пг/мл vs. (20.51 \pm 9.16)пг/мл до лечения, ИФ – γ (50,71 \pm 30,76) пг/мл vs. (26,03 \pm 10,48) пг/мл до лечения), $P < 0,05$. Однако в HBeAg (-) подгруппе подобных достоверных отличий в уровне цитокинов по-сравнению с исходными показателями не наблюдалось ($P > 0,05$).

Выводы. Терапия Бициклолом у пациентов с ХГВ способствует повышению Th1 цитокинов и уменьшению Th2 цитокинов, что демонстрирует клиническое значение Бициклола в иммунной регуляции.

Ключевые слова: Бициклол, хронический гепатит В, цитокины, ИЛ-4, ИФ- γ .

Материал и методы исследования.

Отбор пациентов. В исследовании приняли участие 30 пациентов с верифицированным диагнозом «Хронический вирусный гепатит В» (ХВГВ), наблюдавшиеся амбулаторно в отделении инфекционных заболеваний Южного госпиталя и Центральной муниципальной больницы Huizhou. Возраст пациентов варьировал от 17 до 53 лет (средний возраст 33,6 \pm 8,6). В качестве группы контроля были отобраны 7 здоровых сотрудников. Перед началом исследования у всех участников было исключено ко-инфицирование другими гепатотропными вирусами (HAV, HCV, HDV, HEV), а также HIV. Никто из пациентов в течение предшествующих 3 месяцев не получал иммуномодулирующих препаратов, а также глюкокортикоидов.

Приготовление образцов. 15 мл цельной гепаринизированной крови, взятой перед началом исследования, затем через 1 и 3 мес от начала терапии, соответственно, центрифугировалась в соответствии с методом градиента плотности Ficoll для получения мононуклеаров периферической крови (МПК). Полученные клетки хранились в жидком азоте при $t -196^{\circ}\text{C}$ и тестировались одновременно с другими образцами.

Культура восстановленных клеток. Концентрация клеток $1 \times 10^6/\text{мл}$ устанавливалась с помощью культуральной жидкости RPM – 1640 с 10% фетальной бычьей сывороткой. Эта культура клеток затем высевалась на 24-ячейковую чашку и инкубировалась при t ниже 37°C в присутствии 5% CO_2 в течение 72 часов. Супернатант для тестирования собирался после центрифугирования.

Цитокиновый тест. Для определения уровня сывороточных цитокинов использовался тест двойных антител. Тест системы для определения ИЛ-4, ИЛ-10 и ИФ- γ были предоставлены

компанией R&D, США с соответствующими инструкциями. Для расчета концентрации цитокинов готовились стандартные кривые со стандартным реагентом D (λ). На каждый образец использовалось по 2 ячейки.

Статистический анализ. Для сравнения данных до лечения и после него использовался парный t-тест (self contrast). Для корреляционного анализа применялся линейный корреляционный анализ.

Результаты.

Цитокиновый профиль у здоровых лиц и больных ХГВ. (таб.1)

Исходный уровень ИЛ – 4 в группе ХГВ был достоверно выше, чем в контрольной группе ($P < 0,05$), в то же время уровень ИФ- γ был существенно ниже ($P < 0,01$). Достоверных различий в исходном уровне ИЛ – 10 между обеими группами не наблюдалось ($P > 0,05$).

Таб.1. Уровень ИЛ-4, ИЛ-10 и ИФН- γ в культуре МНПК от пациентов, принимавших Бициклол и здоровых лиц. (pg/ml, $cp \pm SD$)

Группа	ИЛ-4	ИЛ-10	ИФН- γ
Контроль (n=7)	8.24 \pm 4.16	570.41 \pm 265.74	121.68 \pm 44.40
ХГВ (n=30)			
До лечения	17.18\pm7.43^a	604.26 \pm 166.86	36.25 \pm 19.92 ^b
После лечения			
1 мес	12.84 \pm 6.22 ^{ac}	515.78 \pm 163.65 ^c	51.10 \pm 29.69 ^b
3 мес	9.74 \pm 7.75 ^d	523.59 \pm 155.99	53.19 \pm 7.28 ^{bc}

^a $P < 0.05$ vs, ^b $P < 0.01$ vs control, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs уровень до лечения

Влияние Бициклола на цитокиновый профиль при ХГВ (таб.1) На фоне приема Бициклола у пациентов контрольной группы отмечалось постепенное снижение уровня ИЛ – 4. Через 3 мес от начала терапии в уровне ИЛ – 4 по сравнению с исходным наблюдалась достоверная разница ($P < 0,01$) и не было достоверной разницы с уровнем ИЛ – 4 контрольной группы. Также через 1 мес терапии отмечалось существенное снижение уровня ИЛ – 10 ($P < 0,05$). Уровень ИФ- γ существенно повысился на фоне приема Бициклола и достоверно отличался от исходного в группе ХГВ ($P < 0,05$), но по-прежнему был ниже, чем в контрольной группе.

Влияние HBeAg на уровень цитокинов при ХГВ. (таб.2)

При отдельном анализе HBeAg (+) и HBeAg (-) подгрупп в HBeAg (+) группе было также выявлено достоверное снижение уровня ИЛ-4 и повышение ИФ- γ по сравнению с исходными показателями [ИЛ-4 (8,74 \pm 6,12) пг/мл против (20,51 \pm 9,16) пг/мл и ИФ- γ (50,71 \pm 30,76) пг/мл против (26,03 \pm 10,48) пг/мл, соответственно, $P < 0,05$]. В группе HBeAg (-) пациентов аналогичные колебания показателей не были достоверны по сравнению с исходным уровнем ($P > 0,05$).

Таб. 2 ИЛ-4, ИЛ-10 и ИФН- γ в культуре МНПК от HBeAg(+) и HBeAg(-) пациентов, принимавших Бициклол (pg/ml, $cp \pm SD$)

Группа	n	Сроки (мес)	ИЛ-4	ИЛ-10	ИФН- γ
HBeAg(+)	18	До лечения	20.51 \pm 9.16	562.09 \pm 186.70	26.03 \pm 10.48
		1 мес	12.38 \pm 6.56 ^a	439.78 \pm 135.38 ^a	9.99 \pm 16.82 ^a
		3 мес	8.74 \pm 6.12 ^a	457.48 \pm 108.14	250.71 \pm 30.76 ^a
HBeAg(-)	12	До лечения	10.99 \pm 5.03 ^b	639.38 \pm 143.83	41.94 \pm 27.42 ^b
		1 мес	14.20 \pm 6.42	573.95 \pm 147.00	43.27 \pm 30.30
		3 мес	11.03 \pm 9.67	583.41 \pm 182.73	52.87 \pm 32.11

^a $P < 0.05$ vs уровень до лечения; ^b $P < 0.05$ vs HBeAg(+)

Корреляция между изменением активности АЛТ и уровня HBV DNA и уровнем цитокинов до и после лечения.

В настоящем эксперименте уровень вирусной нагрузки HBV DNA находился в обратной пропорциональной зависимости от уровня ИФ- γ ($r = 0.773$, $P < 0.002$), но не коррелировал с уровнем ИЛ – 4 и ИЛ – 10. Активность АЛТ до и после лечения в настоящем эксперименте не коррелировала с уровнем цитокинов.

Обсуждение.

Согласно последним представлениям в иммунологии, после презентации специфического антигена Т-хелперам (Th) антиген-презентирующими клетками (АПК), происходит дифференцировка Th-клеток на две суб-популяции – Th1 и Th2.

Атака антигенов может нарушить баланс Th1/Th2. В нескольких исследованиях было продемонстрировано, что нарушение соотношения Th1/Th2 играет важную роль в хронизации гепатитов.

Цитокины Th1 типа, такие как ИЛ-2, ИФ- γ и TNF- β , продуцируемые Th1-клетками, обеспечивают регуляцию клеточного иммунитета, который коррелирует с воспалительной активностью в печеночной ткани и способствует вирусному клиренсу.

Цитокины Th2-типа, такие как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13, продуцируемые Th2-клетками, обеспечивают регуляцию гуморального иммунитета, напряженность которого коррелирует с хронизацией ХГВ. Таким образом, Th1-клетки способствуют исходу в виде острой самоограничивающейся инфекции и клиренсу HBV, в то время как Th2-клетки способствуют исходу в персистирующую хроническую инфекцию. Дифференцировка Th1 и Th2 клеток четко зависит от секреции ИЛ-4 и ИФ- γ . Результаты настоящего исследования продемонстрировали, что исходный уровень ИЛ-4 в группе пациентов с ХГВ был достоверно выше, чем в контрольной группе ($P < 0,05$), а исходный уровень ИФ- γ был достоверно ниже, чем в контрольной группе ($P < 0,01$), что доказывает, что Th2 клетки занимают доминирующее место у пациентов с ХГВ.

Возникновение, прогрессия и исход заболевания детерминируются эффективностью противовирусного иммунитета человека и ускользанием вируса от иммунного ответа. Будучи ключевыми клетками иммунной регуляции, Th клетки влияют на иммунологический статус организма, а, следовательно, и на исход HBV инфекции. ИФ и ламивудин во всем мире признаны в качестве противовирусных средств, которые могут регулировать уровень Th1/Th2 цитокинов. Улучшение функции Th1 клеток и нормализация соотношения Th1/Th2 часто наблюдаются у пациентов, хорошо ответивших на противовирусную терапию.

Бициклол, разработанный Институтом Материя Медика Китайской Академии Медицинских наук, подтвердил свою эффективность в отношении ХГВ в многочисленных исследованиях. Исследования *in vitro* также доказали его эффективность в отношении HBV, однако точный механизм противовирусного действия Бициклола нуждается в дальнейших исследованиях.

В настоящем исследовании через 3 мес приема Бициклола отмечалось существенное уменьшение концентрации ИЛ-4 по сравнению с исходным уровнем ($P < 0,01$), однако достоверной разницы между лечебной и контрольной группами на том же сроке не наблюдалось. Уровень ИФ- γ на фоне лечения повысился достоверно по сравнению с исходным уровнем ($P < 0,05$), но был по-прежнему ниже, чем в контрольной группе. Эти результаты указывают на то, что терапия Бициклолом может улучшать иммунную функцию Th1 цитокинов и подавлять функцию Th2 цитокинов.

Некоторые исследования продемонстрировали, что циркулирующий HBeAg может подавлять вирусный клиренс из-за активации противовоспалительных Th2 цитокинов и дисбаланса HBeAg/HBeAg и Th1/Th2. Согласно исследованию, в котором изучалась пролиферация специфических лимфоцитов HBeAg с использованием Th колоний периферической крови и ткани печени, проведенному Jiang Ronglong и коллегами, только 15% колоний демонстрируют HBeAg специфичную пролиферацию. В настоящем исследовании исходный уровень ИЛ-4 в группе HBeAg (+) пациентов был достоверно выше, чем в группе HBeAg (-) пациентов ($P < 0,05$), в то время как исходный уровень ИФ- γ был достоверно ниже, чем в контрольной группе ($P < 0,05$), что лишний раз подтверждает приведенное выше предположение. На фоне лечения

Бициклолом в HBeAg (+) группе наблюдались существенные различия в степени понижения ИЛ-4 и повышения ИФ- γ ($P < 0,05$), что указывает на то, что Бициклол оказывает иммунную регуляцию в большей степени у HBeAg (+) по сравнению с HBeAg (-) пациентами.

Некоторые зарубежные ученые считают, что снижение уровня HBV DNA сопровождается повышением уровня ИФ- γ . Изменения активности АЛТ (до и после лечения) не коррелировали с уровнем цитокинов, в то время как уровень HBV DNA до и после терапии Бициклолом был обратно пропорционален уровню ИФ- γ ($r = -0.773$, $P = 0.002$, two-sided), что дополнительно подтверждает высказанное предположение.

Таким образом, на основании полученных результатов можно утверждать, что Бициклол оказывает иммуномодулирующее действие при хроническом вирусном гепатите В. Исследования в данном направлении продолжаются.

Библиография:

1. Milich DR. Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection [J]. *J Virol Hepatol*, 1997, 4(2) : 248-59
2. O'Garra A, Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets [J]. *Immunity*, 1998, 8(3):275-83
3. Bertolotti A, Maini MK. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C virus [J]. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12(4): 403-8
4. Nishimura T, Ohta A. A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice [J]. *J Immunol*, 1999, 162(11):6503-9
5. Rico MA, Quiraga JA, Subira D. Hepatitis B virus-specific T-cell proliferation and cytokine secretion in chronic hepatitis B e antibody-positive patients treated with ribavirin and interferon alpha [J]. *Hepatology*, 2001, 33(1):295-300
6. Rossol S, Marinos G, Garussl P, *et al.* Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for virus clearance in chronic hepatitis B [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(12):3025-33.
7. Boni C, Bertolotti A, Penna A, *et al.* Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(5):968-75
8. Bozkaya H, Bozdayi M, Turkyilmaz R, *et al.* Circulating IL-2, IL-10 and TNF-alpha in chronic hepatitis B: their relations to HBeAg status and the activity of liver disease [J]. *Hepatogastroenterology*, 2000, 47(36):1675-9
9. Pancholi P, Lee DH, Liu Q, *et al.* DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee [J]. *Hepatology*, 2001, 33(2):448-54.