

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ БОЛЕЗНИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

*П.Н. Филимонов, Т.Г. Сухенко,
Н.И. Гаврилова*

**УРОВЕНЬ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-
α В СЫВОРОТКЕ И СТЕПЕНЬ ФИБРОЗА
ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИ-
РУСНЫМ ГЕПАТИТОМ В, С И В + С ПРИ
ЛЕЧЕНИИ ИНТЕРФЕРОНОМ-α**

Медицинская академия, Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Обнаружено, что у детей с хроническим вирусным гепатитом В и С (ХГВ, ХГС) и сочетанным (ХГВС) хроническим вирусным гепатитом уровень ФНО-α в сыворотке выше, чем у здоровых. Полный клинико-вирусологический ответ на лечение интерфероном-α сопровождается уменьшением активности воспаления и фиброза печени, а также снижением уровня ФНО-α. Отмечена положительная корреляция уровня ФНО-α со степенью фиброза печени больных детей.

Журн. микробиол., 2002, № 2, С. 69—72

Ключевые слова: вирусный гепатит, ФНО-α, фиброз, интерферон-α, терапия

ВВЕДЕНИЕ

Фиброз и цирроз печени — частый исход хронических вирусных гепатитов. Прогноз зависит от темпов развития фиб-

*P.N. Filimonov, T.G. Sukhenko,
N.I. Gavrilova*

**LEVEL OF TUMOR NECROSIS FACTOR-α
AND THE DEGREE OF LIVER FIBROSIS IN
CHILDREN WITH CHRONIC VIRUS HEPATI-
TIS B, C AND B+C, TREATED WITH INTER-
FERON-α**

Medical Academy, Institute of Clinical Immunology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia

Children with chronic virus hepatitis B and C, as well as combined chronic virus hepatitis B+C, were found to have a higher level of tumor necrosis factor-α (TNF-α) in their serum than healthy children. Complete clinical and virological response to treatment with interferon-α is accompanied by a decreased inflammation and fibrosis of the liver, as well as by a decreased level of TNF-α, in comparison with nonresponsive patients. Positive correlation between the level of TNF-α and the degree of liver fibrosis in sick children was noted.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2002, No. 2, P. 69—72

Key words: virus hepatitis, tumor necrosis factor-α, fibrosis, interferon-α, therapy

роза печени, которые могут замедляться при успешном лечении интерфероном-альфа (ИФН-α) [15].

Фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-

α) — провоспалительный цитокин, синтезируемый в основном макрофагами, играет важную роль в патогенезе вирусных гепатитов, при которых его уровень в печени и сыворотки крови значительно повышается [2, 6, 8, 9, 14]. ФНО- α , с одной стороны, необходим для пролиферации гепатоцитов и предупреждения их апоптоза при регенерации печени, с другой — является медиатором гепатотоксичности при бактериальных, вирусных и токсических воздействиях [2, 6]. ФНО- α обладает противовирусным эффектом, подавляя репликацию ряда вирусов, в том числе вируса гепатита В [13]. Апоптоз инфицированных гепатоцитов, опосредуемый этим цитокином, препятствует нормальному циклу репликации гепатотропных вирусов [6]. ФНО- α участвует также в фиброгенезе, может обладать как про-, так и противовоспалительными свойствами [3, 7], причем его роль в развитии фиброза печени у детей с хроническими вирусными гепатитами (ХВГ) мало изучена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 49 детей от 2 до 15 лет: 14 с хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ), 11 — С (ХГС), 24 — сочетанным (ХГВС). Группой сравнения были 19 здоровых детей. Критерием диагноза служило не менее чем двукратное обнаружение маркеров HBV и HCV методами ИФА и ПЦР при использовании тест-системы ИФА 3 поколения (ЗАО "Вектор Бест"). Рекombинантный ИФН- α 2 вводили в дозе 3 млн ед. трижды в неделю в течение 12 мес. Серьезных осложнений, потребовавших отмены препарата, не было ни у одного ребенка.

Больным выполняли чрезкожную пункционную биопсию печени иглой Менгини. Биоптаты обрабатывали по общепринятым методикам и заключали в парафин. Все гистологические препараты изучали, не имея на этот момент никакой информации о больном. В срезах, окрашенных гематоксилином и эозином и по ван Гизону, определяли активность воспаления (гистологический индекс степени активности — ГИСА) и степень фиброза в баллах по схеме В. В. Серова, Л. О. Севергиной [1].

Для определения уровня ФНО- α использовали ФНО- α -чувствительную клеточную линию L-929. Суспензию клеток в концентрации 50×10^4 мл помещали в лунки 96-луночного плоскодонного планше-

та ("Linbro") в объеме 100 мкл в среде RPMI-1640 (НПО "Вектор"), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 mM HEPES ("Sigma"), 2 mM L-глутамин (НПО "Вектор"). К клеткам добавляли актиномицин D ("Sigma") в заранее оттитрованной дозе 0,5 мкг/мл в объеме 100 мкл. Сыворотку крови добавляли в лунку в объеме 100 мкл при конечном разведении 1:90, инкубировали 18 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Активность ФНО- α оценивали спектрофотометрически, суправитально окрашивая монослой клеток кристаллиолетом, при длине волны 570 нм. Для стандартной кривой использовали человеческий рекомбинантный ФНО- α . Оптическую плотность переводили в $\mu\text{g}/\text{ml}$ ФНО- α . Количество ФНО- α в сыворотке крови пересчитывали по стандартной кривой с учетом разведения.

Данные в выборках сравнивали с помощью критериев Манна—Уитни и Джонкхиера. Корреляционные связи оценивали с помощью критерия Спирмена. Результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У детей всех 3 групп (ХГВ, ХГС, ХГВС) уровень ФНО- α в сыворотке крови был значительно выше, чем у здоровых детей (табл. 1).

Доля больных, у которых в результате лечения достигнута клинико-вирусологическая ремиссия, была наибольшей при ХГВ (75%), наименьшей — при ХГС (31%). У больных всех 3 групп, ответивших на лечение, уровень ФНО- α был значительно ниже, чем у неответивших. Суммарно у всех отвечающих больных детей уровень ФНО- α после лечения составил $71 \pm 122 \mu\text{g}/\text{ml}$ при $168 \pm 195 \mu\text{g}/\text{ml}$ у неответивших ($p = 0,000002$).

В табл. 2 приведены уровни ФНО- α в зависимости от степени фиброза печени при различных вариантах гепатита (суммарно до и после лечения). При ХГВ и ХГВС усиление процесса фиброобразования сопровождалось увеличением уровня ФНО- α в сыворотке. Имелась положительная корреляция между этими параметрами при ХГВ ($r = 0,76, p = 0,03$), ХГВС ($r = 0,43, p = 0,02$) и суммарно у всех больных ($r = 0,27, p = 0,05$). Уровень ФНО- α коррелировал (у всех больных суммарно) с АЛТ ($r = 0,37, p = 0,007$), ГИСА ($r = 0,26,$

Таблица 1. Содержание ФНО- α в сыворотке крови детей, больных хроническими вирусными гепатитами ($M \pm m$)

Группы детей	Уровень ФНО- α (pg/ml)				p (в сравнении с контролем)
	I	II Отвечающие	III Неотвечающие	II-III	
Здоровые (контроль)	30,4 \pm 33,6 (n=56)	—	—	—	—
ХГВ до лечения	108 \pm 110 (n=33)	—	—	—	0,0003
ХГВ после лечения	122 \pm 180 (n=24)	78,7 \pm 147 (n=18)	253 \pm 218 (n=6)	0,006	0,09
ХГС до лечения	195 \pm 177 (n=27)	—	—	—	1 \times 10 ⁻⁸
ХГС после лечения	69,6 \pm 87,4 (n=24)	30 \pm 10,3 (n=9)	93,4 \pm 104 (n=15)	0,004	0,001
ХГВС до лечения	118 \pm 168 (n=63)	—	—	—	0,006
ХГВС после лечения	136 \pm 155 (n=54)	86,2 \pm 126 (n=15)	173 \pm 168 (n=33)	0,016	4 \times 10 ⁻⁷

$p = 0,05$). Положительная корреляция обнаружена также между степенью фиброза и ГИСА ($r = 0,52$, $p = 0,0002$) у всех больных детей, преимущественно за счет детей с ХГВС ($r = 0,52$, $p = 0,003$). У детей со всеми типами гепатитов степень фиброза печени была, как и уровень ФНО- α , значительно ниже у отвечающих на лечение, в сравнении с неотвечающими, и суммарно составила 2,8 \pm 2,7 и 7,2 \pm 2,1 баллов соответственно ($p = 0,0007$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание ФНО- α в сыворотке больных вирусными гепатитами отражает его уровень в печени, значительно превышая контрольные значения у здоровых, и возрастает с увеличением некротовспалительной активности [6, 14]. Экспрессия mRNA провоспалительных цитокинов, в том числе ФНО- α , обнаружена в зонах мононуклеарной инфильтрации в печени [5, 11], причем значимых различий между ХГС и ХГВ не было найдено, что свидетельствует о схожести их иммунопатогенеза [4]. Наши результаты также свидетельствуют, что уровень ФНО- α отражает активность воспалительного процесса. Показано, что имеется положительная корреляция уровня ФНО- α со степенью фиброза печени у детей. Huang Y.S. и соавт. [8] показали, что при ХГС с циррозом уровень ФНО- α значительно выше, чем у больных без цирроза. Повышение секреции ФНО- α было обнаружено и при экспериментальном СС1 $_4$ -индуцированном циррозе в сравнении с контролем [12]. ФНО- α в опытах *in vitro* подавлял коллагеногенез [7], но *in vivo*, вероятно, преоб-

ладают его профибротические свойства. Цитокин активирует трансформацию клеток Ито в миофибробласты, потенцирует эффекты мощного стимулятора синтеза коллагена — трансформирующего ростового фактора- β [10].

Лечение интерфероном- α подавляет репликацию вируса, продукцию вирусных белков, тормозит высвобождение вирусов из инфицированных клеток, а также обладает иммуномодулирующим действием [15]. Повышенный в течение длительного времени уровень ФНО- α подавляет активность Т-хелперов I типа, угнетая клеточный иммунный ответ [6]. Обнаруженные нами значительно более низкие значения ФНО- α после лечения у отвечающих в сравнении с неотвечающими могут свидетельствовать о подавлении секреции цитокина мононуклеарами печени вследствие уменьшения объема воспалительных инфильтратов, а также об уменьшении супрессивного влияния ФНО- α на иммунный ответ, что, вероятно, способствует подавлению репликации вирусов. Подобные результаты приведены в обзоре [2] — применение ИФН- α при ХГС приводило к

Таблица 2. Уровни ФНО- α (pg/ml) в сыворотке крови больных детей при различной степени фиброза печени ($M \pm m$)

Степень фиброза	Тип гепатита			Суммарно
	ХГВ	ХГС	ХГВС	
I	74 \pm 123	154 \pm 148	70 \pm 67	102 \pm 121
II	325 \pm 287	90 \pm 38	140 \pm 175	152 \pm 179
III	—	42	251 \pm 115	221 \pm 131
p (I—II—III)*	0,08	0,7	0,02	0,04

Примечание. *Критерий Джонкхера.

уменьшению сывороточного уровня ФНО- α у отвечающих, а уровень цитокина перед лечением был значительно выше у неответающих. Возможно, что для осуществления противовирусного эффекта необходимо более низкая концентрация ФНО- α , чем она обычно бывает при персистенции гепатотропных вирусов, когда преобладают гепато- и лимфотоксические свойства ФНО- α .

Наряду у уменьшением некрозовоспалительной активности, лечение ИФН- α приводит и к противофиброзному эффекту — как у отвечающих, так и, в меньшей степени, у неответающих [15], возможно, вследствие подавления экспрессии провоспалительных цитокинов, а том числе ФНО- α [5], и уменьшения в связи с этим воздействий, стимулирующих фибробласты. В подтверждение этого Itoh Y. и соавт. [9] обнаружили при ХГС значительное уменьшение уровня рецепторов к ФНО- α R α 75 у отвечающих в сравнении с неответающими после лечения ИФН- α . Наши данные также свидетельствуют о связи уровня ФНО- α со степенью процесса фиброобразования печени у ответивших на лечение детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Серов В.В., Севергина Л.О. Морфологические критерии оценки этиологии, степени активности и стадии процесса при вирусных хронических гепатитах В и С. *Арх. патол.* 1996, 4: 61 — 64.
2. Brandham C.A., Plümpe J., Manns M.P. et al. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol.* 1998, 275 (Gastrointest. Liver Physiol.) 38: 387 — 392.
3. Elias J.A., Kotloff R. Mononuclear cell-fibroblasts interactions in the human lung. *Chest.* 1991, 99 (3): 73 — 79.
4. Fukuda R., Satoh S., Nguyen X.T. Expression rate of cytokine mRNA in the liver of chronic hepatitis C: comparison with chronic hepatitis B. *J. Gastroenterol.* 1995, 30: 41 — 47.

5. Fukuda R., Ishimura N., Ishihara S. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNAs and interferon efficacy in chronic hepatitis C. *Liver.* 1996, 16 (6): 390 — 399.
6. Herbein G., O'Brien W.A. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000, 223: 241 — 257.
7. Houghlum K., Buck M., Kim D.J. et al. TNF- α inhibits liver collagen- α (1) gene expression through a tissue-specific regulatory region. *Am. J. Physiol.* 1998, 274 (Gastrointest. Liver Physiol.) 37: 840 — 847.
8. Huang Y.S., Hwang S.J., Chan C.Y. et al. Serum levels of cytokines in hepatitis C-related liver disease: a longitudinal study. *Chung. Hua. I. Hsueh. Tsa. Chih.* 1999, 62 (6): 327 — 333.
9. Itoh Y., Okanoue T., Ohnishi N. et al. Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Gastroenterol.* 1999, 94: 1332 — 1340.
10. Kanzler S., Lohse A.W., Keil A. et al. TGF-beta 1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am. J. Physiol.* 1999 (Gastrointest. Liver Physiol.) 39: 1059 — 1068.
11. Nuovo G.J. Histologic distribution of hepatitis A, B, C, D, E, and G with concomitant cytokine response in liver tissue. *Diagn. Mol. Pathol.* 1998, 7 (5): 267 — 275.
12. Orfila C., Lepert J.C., Alric L. et al. Expression of TNF-alpha and immunohistochemical distribution of hepatic macrophage surface markers in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. *Histochem. J.* 1999, 31 (10): 677 — 685.
13. Romero R., Lavine J.E. Cytokine inhibition of the hepatitis D virus core promoter. *Hepatology.* 1996, 23 (1): 17 — 23.
14. Yuan A.L., Luo Y.H., Liu S.D. Tumor necrosis factor alpha levels in patients with chronic liver diseases and its relationship to pathogenesis. *Chung. Hua. Nei. Ko. Tsa. Chih.* 1994, 33 (10): 672 — 674.
15. Zein N.N. Interferons in the management of viral hepatitis. *Cytokines Cell. Mol. Ther.* 1998, 4: 229 — 241.

Поступила 24.07.0