

Зайцева Е.А., Попова Л.Л., Константинов Д.Ю.

## Динамика отдельных показателей цитокинового спектра у больных с HBeAg-негативным гепатитом В на фоне проведения противовирусной терапии

ФГБОУ Самарский государственный медицинский университет, г. Самара

Zayceva E.A., Popova L.L., Konstantinov D.Y.

### The individual dynamics of the cytokine spectrum in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B on the background of antiviral therapy

#### Резюме

Проведен ретроспективный анализ результатов, полученных при динамическом наблюдении за больными хроническим HBeAg-негативным гепатитом В в процессе противовирусной терапии нуклеозидным аналогом гуанозина—энтекавиром в течение 12 месяцев, которые продемонстрировали непосредственный вирусологический ответ. Группы сравнения: больные с устойчивым вирусологическим ответом— группа I (n=36), больные с рецидивом заболевания— группа II (n=122) и группа контроля (n=50). Уровень IL-2 и INF-γ, а также количество ДНК HBV и значения аланиновой аминотрансферазы оценивались в следующие периоды лечения: 1-исходное состояние перед началом ПВТ; 2-через 6 месяцев от начала терапии; 3-в период завершения ПВТ (12 месяцев терапии); 4-через 6 месяцев после завершения терапии. В результате анализа полученных данных был выявлен дисбаланс в содержании сывороточных IL-2 и INF-γ как на старте ПВТ, так и в процессе лечения.

**Ключевые слова:** хронический вирусный гепатит В, цитокиновый статус, противовирусная терапия

#### Summary

A retrospective analysis of the results obtained in the dynamic observation of patients of chronic HBeAg-negative hepatitis B in the process of antiviral therapy nucleoside analogue of guanosine with entecavir for 12 months, which demonstrated the immediate virologic response. Comparison group: patients with a sustained virologic response—group I (n=36), patients with relapse—group II (n=122) and control group (n=50). The level of IL-2 and INF-γ, and the number of HBV DNA and alanine aminotransferase values were estimated at the following periods of treatment: 1-initial state before the beginning of the HTP; 2-after 6 months from the start of therapy; 3-at the end of the OEM (12 months therapy); 4-6 months after completion of therapy. The analysis of the data identified an imbalance in the content of serum IL-2 and INF-γ both at the start of the HTP and during treatment.

**Key words:** Chronic viral hepatitis B, cytokine status, antiviral therapy

#### Введение

Хронический вирусный гепатит В является одной из трудноразрешимых медико-социальных проблем мирового здравоохранения. Это обусловлено широкой распространённостью вируса гепатита В (ВГВ), высокой степенью инфицированности населения (2 млрд человек в мире, из них более 400 млн в стадии хронического гепатита), тяжестью исходов (цирроз печени; гепатоцеллюлярная карцинома) и высокой стоимостью противовирусной терапии. 7-9. Среди инфицированных ВГВ особое место занимает группа пациентов HBeAg-негативным ХГВ, как самая многочисленная в России и наиболее сложная для этиотропного лечения. 2 Недостаточная эффективность противовирусной терапии у больных с естественным течением ХГВ определяется особенно-

стями иммунопатогенеза HBV-инфекции. Известно, что в процессе длительно существующего инфекционного процесса развивается структурно-морфологический и функциональный дисбаланс системы иммунореактивности, который отягощает течение заболевания. Проявлением этого процесса является нарастающая дисфункция системы цитокиновой регуляции. 1,3,4. В имеющейся литературе данные о характере изменения цитокинового спектра у больных HBeAg-негативным гепатитом В в процессе лечения аналогами нуклеоз(т)идов немногочисленны и их результаты неоднозначны, 8 что определяет актуальность нашего исследования.

**Цель исследования:** изучить особенности динамики отдельных показателей цитокинового спектра (IL-2, INF-γ) у больных с рецидивирующим течением HBeAg-

негативного гепатита В в процессе проведения противовирусной терапии нуклеозидным аналогом гуанозина – энтекавиром.

**Материалы и методы**

Под наблюдением находилось 158 больных НВeAg-негативным гепатитом В генотипа Д, в фазе реактивации вируса (ДНК НВV>2.000 МЕ/мл) в возрасте от 22 до 55 лет (56,3% женщины). Ранее этиотропная терапия пациентам не проводилась. Диагноз хронического НВeAg-негативного гепатита В был верифицирован на основании клинико-эпидемиологических, биохимических, серологических и молекулярно-биологических данных. 5 Определение вируса гепатита В (качественно и количественно) проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью набора реагентов «Реал Бест ДНК ВГВ», чувствительностью 5 МЕ/мл (ЗАО «Вектор-бест», г.Новосибирск). Содержание сывороточных цитокинов в плазме определялось с помощью наборов реагентов ЗАО «Вектор-бест», основным компонентом которого являются моноклональные антитела к изучаемым интерлейкинам и интерферонам.

Больным проведена противовирусная терапия (ПВТ) нуклеозидным аналогом гуанозина – энтекавиром по 1 таблетке (0,5мг) в сутки, ежедневно в течение 12 месяцев. Общий период наблюдения за пациентами составил не менее 18 месяцев. Результаты лечения анализировались через 6 месяцев после его завершения. Эффективность оценивалась по нормализации аланиновой аминотрансферазы (АлАТ) и отсутствию вируса ДНК ВГВ в сыворотке крови. Значения уровня IL-2, INF-α, ДНК ВГВ исследовались в следующие периоды лечения: 1 — исходное состояние перед началом ПВТ; 2 — через 6 месяцев от начала терапии; 3 — в период завершения ПВТ (12 месяцев терапии); 4 — через 6 месяцев после завершения терапии. В зависимости от вирусологического ответа были сформированы группы сравнения: группа I (n=36) – больные с устойчивым вирусологическим ответом (УВО) и группа II (n=122) больные с рецидивом заболевания. Для статистической обработки использовался анализ таблиц сопряженности с расчетом статистики хи-квадрат (при размерности таблицы 2 на 2 — с поправкой Йетса либо точный метод Фишера), критерий Манна–Уитни–Вилкоксона и парный критерий Вилкоксона методы статистического анализа с применением пакета прикладных программ Statistica 8.0 для Windows.6 При

описании количественных признаков указаны среднее и его ошибка. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

**Результаты и обсуждение**

Ретроспективный анализ результатов, полученных при наблюдении за больными хроническим НВeAg-негативным гепатитом В в группах сравнения: группа I — с УВО (n=36); группа II — с рецидивом заболевания (n=122) и в группе контроля (здоровые доноры, n=50) представлен в таблицах 1-4.

Более половины (58,4%) пациентов из группы I имели возраст от 22 до 34 лет, а большинство пациентов (62,3%) из группы II относились к старшей возрастной когорте — 35-55 года (хи-квадрат=4,0, p=0,045). При этом женщин среди пациентов группы I было больше, чем в группе сравнения (69,5% и 29,5% соответственно, хи-квадрат=17,1, p<0,001). Особенно это было заметно среди более молодых пациентов, когда доля мужчин составила 71,7% во 2й группе против 19,0% в 1й. ( хи-квадрат=14,1, p<0,001). (таблица 1).

Расчет отношения шансов по всем обследованным показал, что основными факторами риска рецидива являются мужской пол ОШ=5,4 (95% ДИ: 2,4– 12,2, p<0,001) и более старший возраст ОШ=2,3 (95% ДИ: 1,1–4,9, p=0,030).

Эффективность противовирусной терапии оценивалась по отсутствию вируса ДНК ВГВ в сыворотке крови и нормализации АлАТ.

Динамика наступления авиремии на фоне проведения ПВТ представлена в таблице 2. На момент старта противовирусной терапии 56% пациентов группы I имели вирусную нагрузку ДНК ВГВ в сыворотке крови более 20.000 МЕ/мл, у остальных она регистрировалась в диапазоне от 2.000 МЕ/мл до 20.000 МЕ/мл. У пациентов группы II вирусная нагрузка более 20.000 МЕ/мл наблюдалась в 74% случаев. В дальнейшем, на фоне лечения, у больных в группе I к 3-му месяцу ПВТ в 66,6% случаев была достигнута авиремия, а к 6 месяцу лечения исчезновение ДНК вируса произошло в 100% случаев. В группе II после 3-х месяцев лечения вирус не определялся менее чем у половины пациентов у 44,2%. Все пациенты достигли непосредственного вирусного ответа. Реактивация на фоне лечения не была зарегистрирована ни в одном случае.

Таблица 1. Распределение больных хроническим НВeAg-негативным гепатитом В по полу и возрасту

Пол	Распределение больных по возрастным группам					
	22-34 лет		35-55 лет		всего	
	I гр.	II гр.	I гр.	II гр.	I гр.	II гр.
Мужской	4	33	7	53	11	86
	11,1%	27,1%	19,4%	43,4%	30,5%	70,5%
Женский	17	13	8	23	25	36
	47,3%	10,6%	22,2%	18,9%	69,5%	29,5%
Всего	21	46	15	76	36	122
	58,4%	37,7%	41,6%	62,3%	100%	100%

Примечание: в числителе – абсолютное значение, в знаменателе – доля (%)

Таблица 2. Динамика содержания ДНК ВГВ в сыворотке крови хроническим HBeAg-негативным гепатитом В в процессе лечения зидекавиром, МЕ/мл

ДНК ВГВ, МЕ/мл	Группы больных	Периоды наблюдений			
		Старт (1)	Через 3 мес (2)	Через 6 и 12 мес (3)	6 мес после ПВТ (4)
Отр.	I	0 0%	24 66,7%	36 100%	36 100%
	II	0 0%	54* 44,3%	122 100%	34*** 27,9%
менее 2.000	I	0 0%	12 33,3%	0 0%	0 0%
	II	0 0%	51 41,8%	0 0%	36*** 29,5%
2.000 до 20.000	I	16 44,4%	0 0%	0 0%	0 0%
	II	32* 26,2%	17* 13,9%	0 0%	52*** 42,6%
свыше 20.000	I	20 55,6%	0 0%	0 0%	0 0%
	II	90* 73,8%	0 0%	0 0%	0 0%
р для таблицы сопряженности в целом		0,042	0,015	—	<0,001

Примечания: статистическая значимость различий вирусной нагрузки в группах сравнения I и II попарно в различные периоды наблюдения: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Выраженность воспалительного процесса в печени оценивалась по степени повышения АЛАТ (кратность относительно верхней границы нормы (ВГН), см. табл. №3). До начала ПВТ цитолитическая активность оказалась выше у пациентов группы I: число пациентов с АЛАТ до 2 ВГН составило 16,7%, с АЛАТ свыше 5 ВГН МЕ/мл — 58,3%, в отличие от группы II, где соотношение было обратным: больные

со значениями АЛАТ близкими к нормальным составили 52,5%, а пациенты с АЛАТ свыше 5 ВГН МЕ/мл — 21,3%. К 3-му месяцу этиотропного лечения у больных в группе I нормализация АЛАТ произошла в 94,4%, а в группе II — лишь 68,9%. К 6 месяцу лечения у всех пациентов, продемонстрировавших непосредственный вирусологический ответ, значения АЛАТ нормализовались.

Таблица 3. Динамика уровня АЛАТ в сыворотке крови в процессе лечения зидекавиром, МЕ/мл

АЛАТ, МЕ/мл (0-40)	Группы больных	Периоды наблюдений			
		Старт (1)	Через 3 мес (2)	Через 6 и 12 мес (3)	6 мес после ПВТ (4)
Норма	I	1 2,8%	34 94,4%	36 100%	36 100%
	II	25* 20,5%	82** 68,9%	122 100%	27*** 22,1%
До 2 ВГН	I	5 13,9%	2 5,6%	0 0%	0 0%
	II	39 32,0%	38** 31,1%	0 0%	44*** 36,0%
От 2 до 5 ВГН	I	9 25,0%	0 0%	0 0%	0 0%
	II	32 26,2%	0 0%	0 0%	41*** 33,6%
Свыше 5 ВГН	I	21 58,3%	0 0%	0 0%	0 0%
	II	26*** 21,3%	0 0%	0 0%	10 8,3%
р для таблицы сопряженности в целом		<0,001	0,003	—	<0,001

Примечания: Примечания: статистическая значимость различий активности АЛАТ в группах сравнения I и II попарно в различные периоды наблюдения: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Таблица 4. Динамика содержания ИЛ-2, INF-γ в сыворотке крови в процессе лечения хроническим HBeAg-негативным гепатитом В, пг\мл

Показатели (норма в пг\мл)	Здоровые доноры (К)	Группы больных	Периоды наблюдений				Достоверность различий в динамике
			1 (старт ПВТ)	2 (6 мес ПВТ)	3 (12 мес ПВТ)	4 (через 6 мес после ПВТ)	
ИЛ-2 (15-20)	15,61±3,3 n=50	I n=36	9,28±0,12	7,62±0,16	4,03±0,02	12,3±1,28	Ip K-1<0,001 Ip 4-1<0,001 Ip 3-1<0,001 Ip2-1<0,001
		II n=122	5,38±0,89 Ip 1-п p=0,019	2,94±0,00 2p 1-п p<0,001	0,51±0,02 3p 1-п p<0,001	0,28±0,67 4p 1-п p<0,001	Ip K-1<0,001 Ip 4-1<0,001 Ip 3-1<0,001 Ip2-1<0,001
INF-γ (20-25)	19,3±1,1 n=50	I n=36	58,35±7,2	22,60±2,80	20,20±0,63	18,50±3,85	Ip K-1<0,001 Ip 4-1=0,012 Ip 3-1<0,001 Ip2-1<0,001
		II n=122	14,65±1,22 Ip 1-п p<0,001	10,75±0,93 2p 1-п p<0,001	6,90±0,61 3p 1-п p<0,001	5,10±0,44 4p 1-п p<0,001	Ip K-1<0,001 Ip 4-1=0,002 Ip 3-1<0,001 Ip2-1<0,001

Примечания: статистическая значимость различий -Ip - достоверность различий показателей между группами сравнения и контроля; Ip-достоверность различий показателей в группах сравнения I и II попарно в различные периоды наблюдения.

Динамика показателей цитокинового статуса при проведении противовирусного лечения представлена в таблице 4.

Остановимся отдельно на каждом изучаемом параметре. До начала лечения уровень ИЛ-2 (15-20 пг\мл) в обеих группах сравнения был ниже, чем в группе контроля (15,61±3,3 пг\мл): почти в 2 раза у пациентов группы I (9,28±0,12 пг\мл) и более чем в 3 раза в группе II (5,38±0,89 пг\мл). Значения ИЛ-2 в последней оказались значительно ниже не только группы контроля, но и группы I (Ip-I=0,019).

В период проведения ПВТ концентрация ИЛ-2 в группах сравнения постепенно снижалась, достигнув к моменту завершения лечения: в группе I — 4,03±0,02 пг\мл; в группе II — 0,51±0,02 пг\мл (Ip3-1<0,001; Ip3-1<0,001). Через 6 месяцев после завершения ПВТ уровень ИЛ-2 в I группе увеличился до 12,3±1,28 пг\мл, в отличие от показателей у больных группы II, где он оставался крайне низким (0,28±0,67 пг\мл, 4p I-II <0,001).

Содержание INF-γ (норма 10-45 пг\мл) в сыворотке крови на старте ПВТ у больных в I группе было значительно выше (58,35±7,42), а во II — ниже (14,65±1,22) значений группы контроля, IpK-1<0,001. В процессе лечения происходило постепенное снижение уровня INF-γ в сыворотке крови в обеих группах: за первые 6 мес в группе I до 22,20±2,80 пг\мл, в группе II до 10,75±0,93 пг\мл (Ip2-1<0,001; Ip2-1<0,001). В последующем периоде лечения до завершения ПВТ у больных продолжилось снижение концентрации INF-γ: в I группе до 20,20±0,63 пг\мл в группе II до 6,90±0,61 пг\мл (Ip3-1<0,001; Ip3-1<0,001). Особенно во II группы являлось более выраженное снижение значений INF-γ по сравнению с группой I, 3p I-II =0,001. Спустя 6 месяцев после окончания лечения уровень INF-γ в группе II был минимальным за

весь период наблюдения (5,10±0,44; Ip4-1=0,002), а в группе I повысился до 18,5±3,85 пг\мл, Ip4-1=0,012; для обеих групп 4p I-II<0,001).

### Заключение

Таким образом, больные хроническим HBeAg-негативным гепатитом В, леченные энтекавиром в течении 12 месяцев и продемонстрировавшие устойчивый вирусологический ответ (группа I), были моложе, чем больные с рецидивом заболевания (группа II) и среди них, в отличие от пациентов группы сравнения, преобладали женщины. В группе I быстрее наступила авириемия и нормализация аланиновой аминотрансферазы.

Анализ отдельных показателей цитокинового спектра показал, что снижение уровня ИЛ-2, которое наблюдалось у пациентов обеих групп, в процессе проведения противовирусной терапии, после завершения лечения в группе с устойчивым вирусологическим ответом (группа I) повысилось до уровня здоровых доноров, чего не произошло в группе II.

Уровень INF-γ на старте ПВТ у больных в группе I был достоверно выше группы II и группы здоровых доноров. При проведении ПВТ и после ее завершения, уровень INF-γ у всех пациентов имел тенденцию к снижению во все периоды наблюдения. При этом, уровень INF-γ, снижаясь, в группе I достиг значений, близких к показателям здоровых доноров, а в группе II — значений значительно более низких, чем в группах сравнения и контроля (все p <0,001).

С учетом полученных результатов, свидетельствующих о явном различии уровня изучаемых цитокинов у пациентов HBeAg-негативным гепатитом В, в зависимости от вирусологического ответа при ПВТ энтекавиром, а также, принимая во внимание наличие в России лечебных препаратов, созданных по аналогии с ИЛ-2 и INF-γ,

целесообразно в дальнейшем уточнить целесообразность и тактику назначения адьювантной цитокиновой терапии при проведении этiotропного лечения. ■

*Зайцева Екатерина Александровна, заочный аспирант кафедры инфекционных болезней с курсом эпидемиологии ФГБОУ ВО СамГМУ, врач 2-го инфекционного отделения ФГБОУ ВО СамГМУ, г. Самара; Попова*

*Лариса Леонидовна, профессор кафедры инфекционных болезней с курсом эпидемиологии ФГБОУ ВО СамГМУ, д.м.н., г. Самара; Константинов Дмитрий Юрьевич, доцент кафедры инфекционных болезней с курсом эпидемиологии ФГБОУ ВО СамГМУ, к.м.н., г. Самара; Автор, ответственный за переписку - Зайцева Екатерина Александровна, 443028 г. Самара, пос. Мехзавод, квартал 4 дом 2, квартира 9, E-mail: ekasokova@mail.ru.*

## Литература:

1. Габдрахманов И.А. [и др.] Взаимосвязи вирусологических и морфологических показателей в фазах иммунного контроля и реактивации у больных хроническим гепатитом В // Журнал инфектологии, Т.7 №4, 2015, с.37-41.
2. Жданов К.В. Вирусные гепатиты / К.В. Жданов [и др.] – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2011. – 26 с.
3. Ивашкин В.Т. Иммунная система и повреждения печени при хронических гепатитах В и С [Текст] / В.Т. Ивашкин // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2009, № 6, с. 4-10.
4. Ивашкин В.Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени [Текст] / В.Т. Ивашкин // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2009, № 2, с. 8-13.
5. Карандашова И.В., Чуланов В.П. Особенности лабораторной диагностики инфекций. Вирусные гепатиты. Гепатит В // Лабораторная диагностика инфекционных болезней. Справочник. Под. Ред. В.П. Покровского, М.Г. Твороговой, Г.А. Шипулина. М., БИНОМ, 2013. с. 62-74.
6. Юнкеров В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – 2-е изд., доп. – СПб.: ВМедА, 2005 – 292 с.
7. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol 2012; 57(1): 167–185.
7. Stasi C. et al. The epidemiological changes of HCV and HBV infections in the era of new antiviral therapies and the antiHBV vaccine / Stasi C. et al. / Journal of infection and public health. – 2015 Jul 4. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science>.
9. World Health Organization. Hepatitis B Fact sheet, July 2012. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Accessed November 1, 2012.