

ОСОБЛИВОСТІ ГУМОРАЛЬНОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ДО НЕСТРУКТУРНИХ ВІРУСНИХ ПРОТЕЇНІВ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ГЕНОТИПУ ВІРУСУ, РІВНЯ ВІРЕМІЇ ТА ПРОТИВІРУСНОЇ ТЕРАПІЇ

Ж.Б. Клименко, Т.Л. Мартинович, С.В. Федорченко, О.В. Ляшок, В.А. Резник, І.В. Соляник, В.І. Янченко

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України», м. Київ, Україна

Зв'язок з авторами: Клименко Жанна Борисівна, к.м.н., старший науковий співробітник відділу вірусних гепатитів інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України; тел. +380975518903; e-mail: annazh999@gmail.com.

Проаналізовані та визначені особливості гуморальної імунної відповіді у хворих на хронічний гепатит С. Отримані дані свідчать про досить високу гуморальну відповідь на неструктурні вірусні білки до соg антигена, анти-NS3, анти-NS4, які після отримання хворими противірусної терапії мають незначну тенденцію до зниження, в той час як частота зниження ІgМ та анти -NS5 більш виражена.

Ключові слова: гуморальна імунна відповідь, неструктурні вірусні білки, хронічний гепатит С.

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К НЕСТРУКТУРНЫМ ВИРУСНЫМ ПРОТЕИНАМ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ВИРУСА, УРОВНЯ ВИРЕМИИ И ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Ж.Б. Клименко, Т.Л. Мартынович, С.В. Федорченко, О.В. Ляшок, В.А. Резник, И.В. Соляник, В.И. Янченко

ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского НАМН Украины», г. Киев, Украина

Проанализированы и определены особенности гуморального иммунного ответа у больных хроническим гепатитом С. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высоком гуморальном ответе на неструктурные вирусные белки к соg антигена, анти-NS3, анти-NS4, которые после получения больными противовирусной терапии имеют незначительную тенденцию к снижению, в то время как частота снижения ІgМ и анти -NS5 более выражена.

Ключевые слова: гуморальный иммунный ответ, неструктурные вирусные белки, хронический гепатит С.

FEATURES OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO NON-STRUCTURAL VIRAL PROTEINS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C DEPENDING ON VIRUS GENOTYPE, VIREMIA LEVEL AND ANTIVIRAL THERAPY

Z. Klymenko, T. Martynovych, S. Fedorchenko, O. Lyashok, V. Rezyk, I. Solianyk, V. Yanchenko.

SE «Institute of Epidemiology and Infectious Diseases named after L.V. Gromashevskiy of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

The features of humoral immune response in patients with chronic hepatitis C have been analyzed and defined. These data indicate a relatively high humoral response to non-structural viral proteins to core antigen, anti-NS3, anti-NS4, which have a slight tendency to decrease after treatment of patients with antiviral therapy, while the frequency of IgM and anti-NS5 reduction is more evident.

Key words: humoral immune response, non-structural viral proteins, chronic hepatitis C.

Вступ. Актуальність вивчення проблеми вірусних захворювань печінки обумовлена їх широкою поширеністю, ростом інфікованих осіб молодого віку, хронізацією, прогресивним перебігом, тяжкими ускладненнями, інвалідизацією. Досягнення сучасної вірусології, гематології, генетики, біотехнології відкривають нові перспективи для удосконалення діагностики, оптимізації лікування та профілактики вірусних вражень печінки [1, 2, 3].

Гепатотропні віруси (В,С,Д,Г) мають ряд біологічних властивостей, які ускладнюють їх ерадикацію. Персистуючи в організмі багато років, інколи все життя, перш за все в клітинах печінки, віруси здатні до реактивації при порушенні імунного гомеостазу. При інфікуванні вірусом гепатиту С (НСV) в організмі виробляють-

ся антитіла (Ig) до різних антигенних структур вірусу, частково до білків серцевини (core) та неструктурних білків НCV. Останні виконують функції ферментів і беруть участь у формуванні нових, дочірніх РНК вірусу. Антитіла при гепатиті С відносяться до імуноглобулінів різних класів (М, G), визначаються з різною частотою і в різній кількості, мають різні біологічні властивості. Можна вважати, що захисні функції в більшій мірі властиві вірусспецифічним антитілам IgG [4, 5]. Звертає на себе увагу той факт, що у хворих на ХГС в достатньо високому відсотку випадків визначаються маркери реплікації, що свідчить про активне розмноження вірусу. Недостатня елімінація вірусу гепатиту С, вірогідно, пов'язана з його багатогранною мінливістю, в результаті чого утворюється багато близьких, але імунологіч-

но різних, антигенних структур. Антитіла, що синтезуються в організмі, які нейтралізують віруси, володіють високою специфічністю. Вони інактивують раніше діючи на імунну систему антигени, але не здатні нейтралізувати знов-і-знов утворюючі антигенні «квазиваріанти» вірусу, що дозволяє йому уникати імунного контролю [6, 7]. Висока швидкість мутації вірусу призводить до постійної напруженості імунної системи. Імунна відповідь втрачає свою направленість, ніби «розмивається», що знижує його захисну активність, ускладнює повну ерадикацію вірусу і не захищає від повторного інфікування іншими генотипами або мутантними формами HCV [8]. В нашому повідомленні представлені результати вивчення при ХГС частоти визначення та реактивності антитіл IgM та IgG до антигенів структурних білків (core) та неструктурних білків (NS) HCV. Особлива увага приділена вивченню співвідношення вірус-специфічних антитіл з вірусологічними показниками, їх діагностичної і прогностичної значимості, а також впливу протівірусної терапії (ПВТ) на їх реактивність.

Метою нашого дослідження було вивчення діагностичної значимості гуморальної імунної відповіді на вірусні протеїни при оцінці генотипу та вірусного навантаження у хворих на ХГС, а також динаміки спектру антитіл до різних антигенних структур вірусу в процесі ПВТ.

Матеріали та методи. У дослідження ввійшли 212 хворих на ХГС, які знаходились на стаціонарному та

амбулаторному лікуванні у відділі вірусних гепатитів та СНІДу ДУ «ІЕІХ НАМНУ». Групу склали 121 (57,1%) чоловік та 91 (42,9%) жінка. Переважали особи молодого та середнього віку до 50 років – 162 хворих (76,41%). Середній вік становив $37,74 \pm 1,20$, середня тривалість захворювання від 1 до 15 років, в цілому по групі – $7,48 \pm 0,60$ років.

Всі пацієнти були розподілені на дві групи: I група – хворі на HCV-інфекцію з 1-им генотипом – 144 (67,9%) та II група – 68 (32,1%) осіб з 3-а генотипом HCV.

Застосування наркотичних речовин як фактор ризику інфікування HCV підтвердили 28 (13,20%) пацієнтів. Гемотрансфузії в анамнезі мали місце у 8 (3,77%) пацієнтів, оперативні втручання – у 59 (27,83%), часті відвідування стоматолога відзначали 36 (16,98%) хворих, робили татуаж – 11 (5,19%). У 70 осіб (33,03%) навіть при детально зібраному анамнезі не вдалося встановити шлях інфікування HCV.

Всім пацієнтам, які були включені в дослідження, проводили загальноклінічні, біохімічні, серологічні та вірусологічні обстеження. Діагноз ХГС встановлювали на основі виявлення антитіл до HCV, неструктурних вірусних білків за допомогою імуноферментного аналізу та РНК-HCV методом полімеразної ланцюгової реакції при наявності у хворих клінічних та лабораторних ознак хронічного гепатиту на протязі 6 місяців. Вірус-специфічні антитіла у сироватці крові визначали ІФА методом з викорис-

танням тест-систем третьої генерації для диференційного виявлення антитіл до антигенів вірусу гепатиту С Вітро-тест (анти-НСV – Differens, Київ, Україна). Для визначення IgM використовували імуноферментні тест-системи Ricombi Best – анти-НСV IgM (Вектор, Росія). Методики дозволяють ідентифікувати специфічні анти-НСV IgG до індивідуальних вірусних протеїнів (ІВП): структурного (сog-протеїну) та неструктурних вірусних білків (НВБ) – NS3, NS4, NS5. Сироватку, яка реагує з двома та більше білками, що кодуються різними генами НСV, вважали анти-НСV позитивною. У випадках наявності реактивності до одного чи двох білків, що кодуються одним геном, результат розглядали як невизначений. Реактивність сироваток до кожного ІВП визначалась по коефіцієнту позитивності (R) – це відношення оптичної щільності зразка до критичної оптичної щільності. При $R > 1$ сироватку вважали позитивною, при $R < 1$ – негативною. РНК-НСV в клінічному матеріалі визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією в режимі реального часу.

Обов'язковим було визначення вірусного навантаження та генотипу

НСV, відсутність маркерів вірусних гепатитів іншої етіології, а також вірусу імунодефіциту людини. Всім хворим проводився малоінвазивний клініко-біохімічний тест «Acti-Test» та «Fibro-Test», який базується на виявленні активності хронічного гепатиту та фіброзу печінки за системою METAVIR або проводили еластографію печінки. За ступенем фіброзу пацієнтів розподіли наступним чином: мінімальний фіброз F0-F1 був у 116 (54,72%) осіб, F2 – у 36 (16,98%), високий ступінь фіброзу F3 мали 32 (15,09%) та F4 – 28 (13,21%) пацієнтів.

Високе вірусне навантаження (кількість РНК-НСV, визначене в міжнародних одиницях в 1 мл сироватки крові, вище 400000 МО/мл) встановили у 118 (55,66%) хворих та у 94 (44,34%) осіб було низьке вірусологічне навантаження.

Розподіл хворих за генотипом та вірусним навантаженням наведені в табл. 1.

67,92% хворих на ХГС мали супутню патологію; найчастіше зустрічалась патологія з боку шлунково-кишкового тракту (75,0%): холецистити, гастродуоденіти, виразкова хвороба 12-палої кишки; цукровий діабет відмічався у 5,66% хворих, аутоімунний тиреоїдит у 15,09% осіб. Патологія з

Таблиця 1.

Розподіл хворих на ХГС за генотипом та вірусним навантаженням

| Хворі на ХГС | Кількість | % |
|-------------------------------|-----------|-------|
| Генотип-1в | 144 | 67,92 |
| Генотип-3а | 68 | 32,08 |
| Вірусне навантаження – високе | 118 | 55,66 |
| низьке | 94 | 44,34 |

боку інших органів та систем (серцево-судинної, шкіри) мала місце в поодиноких випадках.

Результати та обговорення. Проводилось співставлення показників антитіл до coreAg, NS3, NS4, NS5 у хворих на ХГС в залежності від генотипу та рівня вірусного навантаження (табл. 2).

При вивченні спектру антитіл IgG у сироватках крові 212 хворих на ХГС антитіла IgG до core – Ag були виявлені у 100% випадків; їх реактивність сироваток склала $13,7 \pm 5,3$, IgG до HCVNS3 в 91,04%, реактивність сироваток – $16,8 \pm 6,1$, IgG до HCVNS4 у 88,21% (р.с. $15,7 \pm 5,7$), IgG до HCVNS5 - 82,55% (р.с. $16,4 \pm 6,2$) (рис.1).

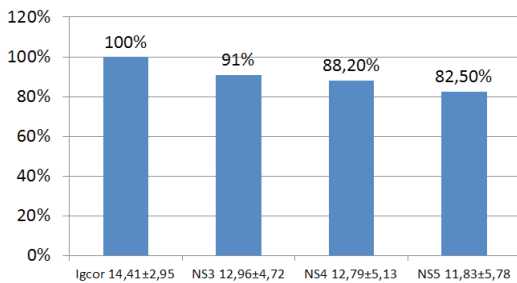


Рисунок 1. Спектр антитіл IgG у хворих на ХГС (n=212).

Отже, антитіла IgG до антигенних структур HCV визначались у хворих

на ХГС у великому відсотку випадків і високій реактивності сироваток крові.

Частота визначення антитіл IgM до HCV у хворих на ХГС склала 36,32%, (оптична щільність $3,36 \pm 3,2$ од.опт.щ.) і була суттєво нижчою, ніж IgGHCV. Цей маркер поряд з RNA-HCV є показником активності інфекційного процесу.

Вивчаючи залежність гуморальної імунної відповіді у хворих на ХГС від рівня вірусного навантаження, було розподілено всіх обстежуваних пацієнтів на 2 групи, в залежності від рівня вірусологічного навантаження: з ВВН, куди увійшло 118 осіб, та з НВН – 94 хворих (критерії розподілу були вказані вище). При високому вірусному навантаженні (ВВН) повний блот IgG був виявлений у 90 хворих (76,3%), неповний у 28 (23,7%). У хворих на ХГС з низьким вірусним навантаженням (НВН) повний блот спостерігався у 62 (65,9%), неповний у 32(34,1%); (p=0,0667, p>0,05) (рис. 2).

Достовірних величин отримано не було, але відмічалась тенденція до збільшення відсотку пацієнтів з непо-

Таблиця 2.

Частота виявлення антитіл до білків HCV у хворих на ХГС

| Антитіла HCV | Хронічна HCV-інфекція | |
|-----------------|-----------------------|-------|
| | кількість | % |
| Ig M- Ab HCV | 77 | 36,32 |
| Ab-HCV | 212 | 100 |
| Ab- C 22p(core) | 212 | 100 |
| Ab-C 33c(NS3) | 193 | 91,04 |
| Ab-C 100p(NS4) | 187 | 88,21 |
| Ab-NS5 | 175 | 82,55 |

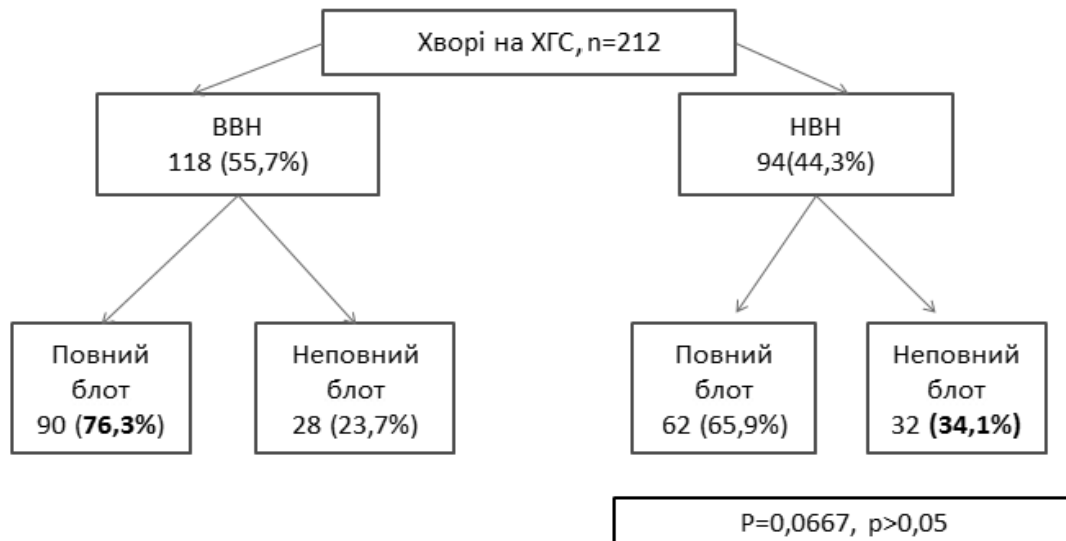


Рисунок 2. Розподіл хворих на ХГС в залежності від рівня вірусного навантаження

вним блотом (тобто відсутністю одного чи двох неструктурних вірусних білків) у хворих на ХГС з низьким вірусним навантаженням.

Аналізуючи рівень показників анти – HCV до coreAg, неструктурних вірусних білків NS3, NS4, NS5, була відмічена прямо пропорційна тенденція до зростання показників NS3, NS4, NS5 в залежності від величини вірусного навантаження, що відповідає світовим літературним джерелам про чітку кореляцію гуморальної відповіді до неструктурних вірусних протеїнів з рівнем RNA-HCV.

Залежність рівня вірусного навантаження від генотипу HCV відображено в табл. 3.

Отже, залежно від генотипу HCV, можна відмітити більш виражену тенденцію до збільшення відсотка хворих на ХГС з відсутністю у них тих чи інших неструктурних вірусних протеїнів (тобто неповний блот) з низьким вірусним навантаженням, а саме при генотипі 3 порівняно з генотипом 1 (рис.3, 4).

Найбільш це стосується антитіл до NS5 (71,4%) – неповний блот при генотипі 3 з НВН. Адже NS5 є компонентом реплікативного комплексу HCV

Таблиця 3.

Рівень вірусного навантаження в залежності від генотипу HCV

| Показник | 1 генотип | | 3 генотип | |
|----------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | Повний блот | Неповний блот | Повний блот | Неповний блот |
| ВВН | 62 (83,8%) | 12 (16,2%) | 28 (63,5%) | 16 (36,4%) |
| НВН | 52 (74,3%) | 18 (25,7%) | 10 (41,7%) | 14 (58,3%) |
| Всього | 114 (79,2%) | 30 (20,8%) | 38 (55,9%) | 30 (44,1%) |

p=0,1155, p>0,05; p=0,0684, p>0,05

та виконує функцію РНК-залежної РНК-полімерази. В умовах припинення стимуляції імунної системи фер-

ментами, що приймають участь у його реплікації, концентрація анти-HCV IgGNS5 суттєво знижується.

| | Cоr | | NS3 | | NS4 | | NS5 | | Разом | |
|-------|-----------|------|-----------|-------------|-----------|------|-----------|-------------|-----------|------|
| | Кількість | % | кількість | % | кількість | % | Кількість | % | кількість | % |
| НВН | 4 | 28,6 | 5 | 35,7 | 5 | 35,7 | 10 | 71,4 | 14 | 46,7 |
| ВВН | 1 | 6,25 | 9 | 37,5 | 5 | 31,2 | 10 | 62,5 | 16 | 53,3 |
| Разом | 5 | 16,7 | 14 | 46,7 | 10 | 33,3 | 20 | 66,7 | 30 | 100 |

- NS5 – компонент реплікативного комплексу HCV, виконує функцію РНК-залежної РНК-полімерази.
 - При 3 генотипі привалює імунна відповідь до NS5.
- При зростанні вірусного навантаження збільшується відповідь до NS3.

Рисунок 3. Генотип 3, неповний блот.

| | Cоr | | NS3 | | NS4 | | NS5 | | Разом | |
|-------|-----------|------|-----------|------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-----|
| | кількість | % | кількість | % | кількість | % | кількість | % | кількість | % |
| НВН | 2 | 11,1 | 3 | 16,7 | 10 | 55,5 | 10 | 55,5 | 18 | 60 |
| ВВН | – | – | 2 | 16,7 | 5 | 41,7 | 7 | 58,3 | 12 | 40 |
| Разом | 2 | 6,7 | 5 | 16,7 | 15 | 50 | 17 | 56,7 | 30 | 100 |

При 1 генотипі з НВН – привалює відповідь до білків NS4, NS5 у співвідношенні 1:1, з ростом вірусного навантаження збільшується відповідь до NS5

Рисунок 4. Генотип 1, неповний блот

ПВТ направлена на інактивацію вірусу гепатиту С, порушення синтезу нової РНК, вибірккову деструкцію інфікованих клітин. Цим цілям, в значній мірі, служить інтерферонотерапія. Інтерферони володіють противірусними, протизапальними, імунномодулюючими та антипроліферативними властивостями. Інтерферони інгібують реплікацію тільки тих вірусів, які активно розмножуються, не впливаючи на латентну інфекцію. Отже, враховуючи це, основним показанням до інтерферонотерапії є наявність в організмі збудника інфекційного процесу в активному стані, а саме маркера реплікації – RNA-HCV. Ефективність інтерферонотерапії при ХГС визначається такими факторами як тривалість та активність хвороби, вік, наявність ускладнень, супутня патологія, генотип вірусу, вірусне навантаження, IL28-B, ШВВ, ступінь фіброзу.

Всім 212 хворим на ХГС була проведена комбінована ПВТ, а саме – інтерферонотерапія пегільованим інтерфероном альфа 2-а. Найбільш чутливими до дії інтерферонів виявились IgM-HCV, частота виявлення і концентрація яких знижувались з 36 до 23%, з 0,7 до 0,4 од.опт.щ., відповідно (рис. 5).

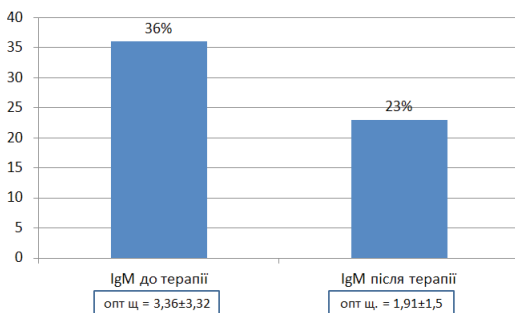


Рисунок 5. IgM до HCV при ХГС до/після ПВТ

Подібна картина спостерігалась і по відношенню IgG до HCVNS5, у меншій мірі реагували на препарат IgG до HCVNS4 і IgG-HCVNS3. Слід підкреслити, що реактивність сироваток крові до анти-HCVNS3 та IgG до HCVcor у деяких хворих навіть де-що зростала на фоні зниження рівнів IgM-HCV та IgGNS5 (рис. 6).

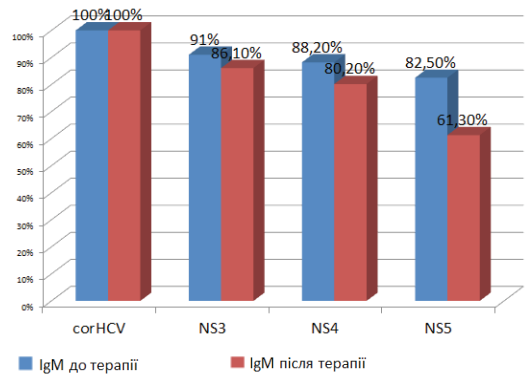


Рисунок 6. Спектр антитіл IgG у хворих на ХГС до/після ПВТ.

Отже, імунологічна пам'ять до неструктурних вірусних білків нетривала та у випадку припинення реплікації HCV (а це ПВТ) відбувається зниження стимуляції ними імунної системи хазяїна – титри антитіл до NS3, NS4, NS5 швидко знижуються. Найрідше серед пацієнтів нашого дослідження ідентифікувалися анти-HCVIgM та IgGNS5 порівняно с IgGNS4 та IgGNS3.

Зміна концентрації вірус-специфічних антитіл, зниження рівня гамма-глобулінів, біохімічних показників активності хвороби, зникнення RNAHCV супроводжувались покращенням клінічної картини хворих (зменшення вираженості астеничного та больового синдромів), позитив-

ними морфологічними змінами (зниженням активності запального процесу, лімфоїдно-клітинної інфільтрації портальних трактів).

Висновки:

1. При ХГС утворюються антитіла до різних антигенних структур вірусу гепатиту С, які є імуноглобулінами різних класів і володіють різними біологічними властивостями.

2. Найчастіше та у високій концентрації визначаються антитіла IgG до антигенів HCV core, NS3, NS4, рідше і в меншій кількості – анти-IgM та IgG до NS5 HCV.

3. Відмічається тенденція до кореляції антитіл до неструктурних вірусних протеїнів з рівнем вірусного навантаження та чітка кореляція з генотипом HCV.

4. З найбільшою частотою мала місце відсутність антитіл до NS5 (17,5%).

5. При лікуванні пегільованими інтерферонами хворих на ХГС найбільш виражено знижується частота виявлення і концентрація анти-IgM та IgG до NS5 HCV. Поряд з цим зменшуються ознаки клінічної та біологічної активності хвороби.

Література

1. Клименко Ж.Б. Особенности гуморального иммунного ответа на неструктурные вирусные протеины и факторы, влияющие на спонтанный клиренс HCV, у пациентов с хроническим гепатитом С/ Ж.Б.Клименко// Клиническая инфектология и паразитология. - 2014. - №3(10). – С.62-68.
2. Малый В.П. HCV – инфекция (острая и хроническая) /В.П.Малый.- К., 2005. - 292 с.
3. Мицура В.М. Генотипы вируса гепатита С и нуклеотидная последовательность локуса NS3 у пациентов с хроническим гепатитом С в Гомельской области/ В.М.Мицура, Е.В.Воропаева, О.В.Осипкина // Клиническая инфектология и паразитология. – 2014. - №3(10). – С.79-85.
4. Особенности иммунного ответа у больных хроническим вирусным гепатитом С / Ивашкин В.Т, Маммаев С.Н., Лукина Е.А.[и др.]//Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.-2001.-№3 – С.24-28.
5. Федорченко С.В. Хроническая HCV - инфекция /С.В. Федорченко. - К. : Медицина, 2010.-272 с.
6. Федорченко С.В. Клиническое значение определения антител к неструктурным вирусным протеинам при острой и хронической HCV-инфекции // Клиническая инфектология и паразитология.- 2013.- №2(05).- С.59 – 68.
7. Thomas D.L. The natural history of hepatitis C virus infection / D.L. Thomas, J. Astemborski, RM Rai [et al.] / JAMA -2000. - Vol. 284 , № 4 . - P.450 -456.
8. Condotti D. Frequent recovery and broad genotype 2 diversity characterize hepatitis C virus infection in Ghana / D. Condotti , J. Temple , F. Sarkodie , J. Allain / J . Virol . - 2003 . - Vol.77 , № 14. - P. 7914-7923.
9. Thompson, A.J.V.,McHutchison J.G.(2009) Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). J. Vir. Hepatit.,vol. 16,no 6,pp. 377-387.
10. Kieffer T.L., George S.(2014)Resistance to hepatitis C virus protease inhibitors. Curr.Opin. Virol.,vol.8,pp.16-21.DOI:10.1016/j.coviro.2014.04.008.