

Lavori
originali

Original
articles

Associazione tra elevati livelli sierici di IL-8 e resistenza alla terapia combinata con PEG-interferon + ribavirina nell'epatite cronica attiva HCV+

Association between raised IL-8 serum levels and resistance to combined PEG-interferon + ribavirin therapy in HCV+ active chronic hepatitis

Bruno Cacopardo¹, Luciano Nigro¹, Giuseppe Nunnari¹,
Giuseppe La Medica¹, Alessandro Cappellani², Filippo Palermo¹,
Elisa Cappello¹, Rosario Russo¹

¹Sezione di Malattie Infettive, Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Specialistica;

²Chirurgia Generale e Senologia, Dipartimento di Chirurgia, Università di Catania, Italy

INTRODUZIONE

L'infezione da HCV interessa oggi circa il 3% della popolazione mondiale, con un 85% delle infezioni primarie che vanno incontro a cronicizzazione di cui circa il 20% sviluppa nel tempo serie complicanze quali cirrosi epatica e carcinoma epatocellulare ed eventualmente morte dovuta a grave insufficienza epatica [1]. Nell'ultima decade, le terapie utilizzate nel trattamento dell'epatite cronica C hanno mostrato un impatto molto favorevole sulla storia naturale della malattia, ottenendo tassi di risposta virologica sostenuta dell'80% nelle infezioni da genotipo 2 e 3 trattate con PEG IFN α 2b + ribavirina [2]. Purtroppo, più del 50% dei pazienti con infezione da HCV genotipo 1 rimane a tutt'oggi resistente alle più potenti combinazioni terapeutiche. I meccanismi di resistenza dell'HCV all'IFN naturalmente prodotto dall'organismo agiscono a due livelli: da un lato alterando gli effetti antivirali diretti dell'IFN attraverso l'induzione di proteine antivirali quali la PKR, una proteina chinasi cellulare, dall'altro lato modificando l'effetto immunomodulatorio con sbilanciamento del pattern citochinico Th1-Th2 ed iperproduzione di IL-8 [1].

Questa capacità di resistenza può essere comunque superata con la somministrazione di IFN esogeno riducendo in tal modo la replicazione virale sin dalle prime 48 ore [3]. In effetti l'utilizzo di molecole a lunga durata d'azione (e.g., interferon pegilato) determinano tassi di risposta nettamente migliori della monoterapia con interferone standard, in particolare con l'aggiunta della ribavirina, che agisce simultaneamente da agente antivirale e da modulatore della risposta immune [4].

Oggi, uno degli obiettivi principali della ricerca clinica sulle epatiti croniche virus-correlate, è quello di identificare marcatori non invasivi e sufficientemente sensibili e specifici che consentano di predire il grado di severità e di progressione della malattia epatica, sostituendosi possibilmente alla biopsia, e di predire la risposta alla terapia antivirale. Particolarmente importante quest'ultimo punto, in considerazione del fatto che, come già detto, nonostante le più recenti introduzioni terapeutiche, circa la metà dei pazienti trattati nel nostro territorio (prevalentemente di genotipo 1) è sottoposta ad uno spreco di risorse, tempo e benessere senza peraltro giungere ad alcun risultato duraturo. Molti sforzi sono stati fatti nella ricerca di

markers predittivi dell'outcome terapeutico dell'ECA HCV+ e promettenti risultati sono scaturiti dal riscontro dei livelli sierici di alcune citochine pro-infiammatorie come TNF α ed IL-8. In particolare, alcuni studi si sono concentrati sul ruolo di IL-8, una citochina proinfiammatoria ad azione chemiotattica sui neutrofili, che sembrerebbe in grado di inibire l'azione antivirale dell'IFNalfa.

Precedenti lavori hanno dimostrato l'efficacia predittiva dei livelli sierici di IL-8 nel corso del trattamento dell'ECA HCV positiva con interferone standard, con e senza ribavirina. A nostra conoscenza, questa è la prima esperienza relativa allo studio della cinetica plasmatica di IL-8 nei pazienti sottoposti a terapia di combinazione con interferone pegilato e ribavirina.

PAZIENTI E METODI

Sono stati arruolati 44 pazienti affetti da ECA HCV+ avviati consecutivamente a terapia combinata con PEG IFN α 2b al dosaggio di 1,5 μ g/kg/sett e ribavirina alla dose di 1.000-1.200 mg/die. La schedula terapeutica prevedeva un trattamento protratto per 48 settimane (in considerazione del fatto che tutti i pazienti arruolati erano infettati con HCV genotipo 1) con 24 settimane di *follow-up* post-terapia. Nel corso del trattamento e del *follow-up* sono stati effettuati controlli clinici mensili con contemporanea determinazione delle transaminasi sieriche. La misurazione dei livelli quantitativi di HCV RNA è stata effettuata trimestralmente mediante Cobas amplicor HCV Monitor Test, version 2,0 (Roche Diagnostics). I pazienti che hanno dimostrato il mancato declino di almeno 2 log di HCV RNA alla dodicesima settimana di trattamento, sono stati considerati *non responders* ed hanno interrotto la terapia.

I genotipi HCV sono stati determinati al momento dell'arruolamento mediante Inno LiPA HCV II assay (Innogenetics).

Il dosaggio di IL-8 su siero di pazienti e controlli è stato effettuato utilizzando la metodica ELISA mediante kit Quantikine Human IL-8 R&D System. L'IL-8 sierica è stata dosata una singola volta nel gruppo di controllo. Nei pazienti affetti da epatite cronica C i livelli sierici di IL-8 sono stati dosati ad inizio terapia, al termine delle 48 settimane di trattamento ed alla fine del *follow-up* post-terapia. Nei pazienti che hanno interrotto la terapia per mancata risposta virologica, i livelli sierici di IL-8 sono stati mi-

surati al momento della interruzione e, successivamente, dopo 6 mesi dallo stop. I pazienti che hanno interrotto la terapia per l'insorgenza di effetti collaterali sono stati invece esclusi dalla valutazione.

L'elaborazione statistica dei risultati è stata svolta mediante Student's t test per dati non appaiati ed ANOVA ad 1 o 2 criteri di classificazione con test di Newman-Keuls per confronti multipli.

RISULTATI

La Tabella 1 documenta le caratteristiche basali epidemiologiche, cliniche, virologiche ed istologiche nei pazienti con epatite cronica C arruolati nello studio.

Quattro pazienti (9%) hanno interrotto prematuramente la terapia a causa dell'insorgenza di eventi avversi gravi. Ventuno pazienti (47%) sono stati complessivamente valutati come non responsivi al trattamento: 13 hanno interrotto alla dodicesima settimana per mancata evidenza della risposta virologica precoce, 8 hanno recidivato durante il *follow-up* post-terapia. Complessivamente, dunque, 19 pazienti (43%) han-

Tabella 1 - Parametri epidemiologici e clinici basali nei 44 pazienti con Epatite Cronica Attiva HCV+ arruolati.

	ECA	Controlli
N.	44	30
Età (anni)	36 $\pm$ 11	38 $\pm$ 9
Sesso (M/F)	23/2	15/15
HBsAg +	0	0
HIV+	0	0
HCV+	44	0
ALT UI/l	102 $\pm$ 44	21 $\pm$ 12
Genotipo 1a/1b/2/3	2/42/0/0	
HCV RNA (UI/ml $\times$ 103)	476 $\pm$ 110	
Knodell HAI score	9.2 $\pm$ 2	
ECA lieve	16	
moderata	20	
grave	8	
Cirrosi	0	
Durata malattia (mesi)	22 $\pm$ 9	

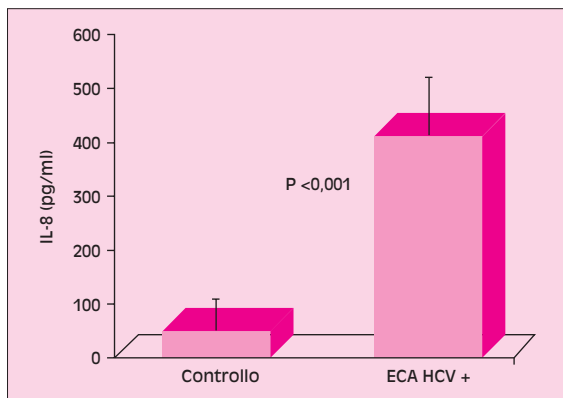


Figura 1 - Livelli sierici basali di IL-8 nei pazienti con ECA HCV+ e nei controlli.

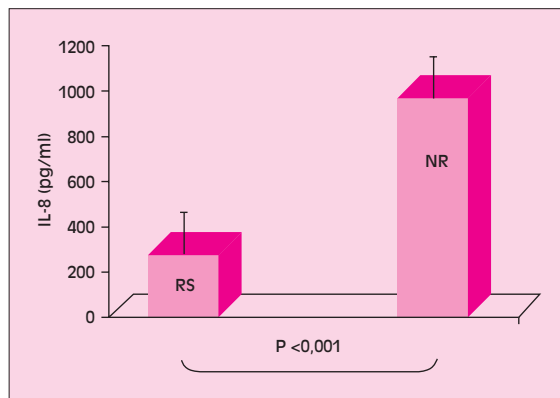


Figura 2 - Livelli sierici basali di IL-8 in accordo con la risposta alla terapia con PEG-IFN e Ribavirina.

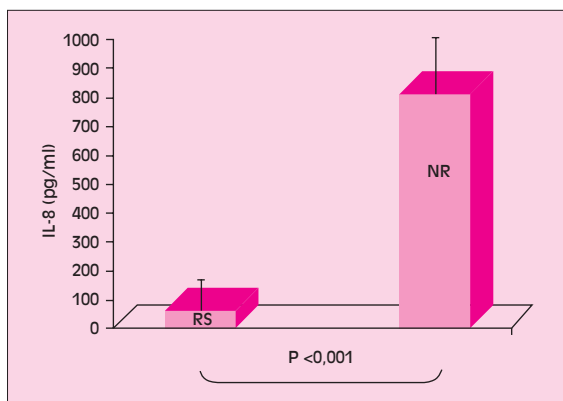


Figura 3 - Livelli sierici di IL-8 misurati a fine terapia in accordo alla risposta al trattamento con PEG-IFN e Ribavirina.

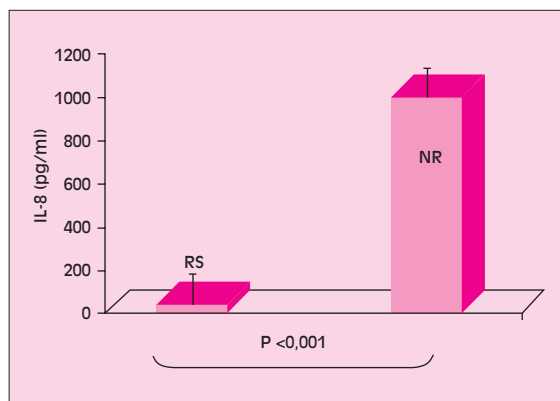


Figura 4 - Livelli sierici di IL-8 misurati alla fine del follow-up post-terapia in accordo alla risposta alla terapia con PEG-IFN e Ribavirina.

no dimostrato il raggiungimento della risposta virologica sostenuta.

I livelli di IL-8 misurati prima di iniziare la terapia risultavano significativamente più elevati ($p < 0,001$) nei pazienti ECA HCV+ rispetto ai controlli sani (Figura 1). All'interno del gruppo dei pazienti con ECA HCV+ avviati al trattamento con interferone pegilato e ribavirina, i valori basali di IL-8 sono risultati significativamente ($p < 0,01$) più bassi in coloro che avrebbero ottenuto la risposta virologica sostenuta rispetto ai non responders (Figura 1). Anche i livelli di IL-8 misurati a fine terapia (Figura 2) ed a fine *follow-up* (Figura 3).

Infine, valutando la cinetica dei livelli di IL-8 sierica nei diversi gruppi di risposta alla terapia durante l'intero periodo di studio (12 mesi di terapia più 6 mesi di *follow-up*), si evinceva come nei pazienti RS i livelli di IL-8 mostrassero un progressivo e significativo declino dall'inizio del trattamento al termine del *follow-up*.

Al contrario, nel gruppo dei non responders, i livelli di IL-8 non subivano significative variazioni durante e dopo la terapia (Figura 4).

■ DISCUSSIONE

La cronicizzazione dell'infezione da virus HCV dipende dall'equilibrio tra il tasso di replicazione virale e la rapidità, la specificità e l'efficacia della risposta immunitaria dell'ospite. Infatti, uno sbilanciamento nella produzione di citochine Th1/Th2 può contribuire alla progressione della malattia o all'incapacità di attuare la *clearance* di HCV.

Di recente, sono stati identificati nuovi markers associati alla gravità della malattia e alla responsività virologica alla terapia interferonica [5].

Nel 1995, Enomoto e coll. hanno descritto una sequenza nucleotidica, l'ISDR (*Interferon Sensitivity Determining Region*), nell'ambito del gene NS5A

dell'HCV genotipo 1b, che una recente metanalisi ha confermato essere positivamente associata con la resistenza clinica all'IFN [6, 7]. Gale et al. hanno per primi riportato l'inibizione, mediata dalla proteina NS5A, sulla proteina chinasi cellulare PKR che, indotta dall'IFN, è in grado di mediarne gli effetti antivirali [8]. Mutazioni inattivanti la regione ISDR della proteina NS5A impediscono l'interazione tra questa e la PKR, permettendo che quest'ultima svolga la sua attività antivirale [9].

Esiste, inoltre, un ulteriore meccanismo che chiarisce la resistenza alla terapia con IFN, anche questo mediato dalla sequenza genomica NS5A: quest'ultima, infatti, attiverebbe l'IL-8 promoter inducendo l'espressione di IL-8, una citochina ad azione chemiotattica sui neutrofili, che inibisce l'azione antivirale dell'IFN [10]. L'azione della proteina di HCV, NS5A, spiega quindi come nel siero dei soggetti ECA HCV+ i livelli di IL-8 siano mediamente più elevati che nei controlli non infetti [11]. Su questa base, assumendo che il livello di replica di HCV sia direttamente correlato ai livelli endogeni di IL-8, Koo et al. hanno inibito la produzione di IL-8 tramite un RNAi e, in effetti, hanno verificato che il *knockdown* di IL-8 si associava ad una inibizione della replica di HCV su linee cellulari permissive [12].

Nei soggetti ECA HCV+ trattati con il solo IFN, elevati livelli sierici di IL-8 sarebbero associati al fallimento della terapia così come elevati livelli intraepatici di IL-8 mRNA sarebbero caratteristici dei pazienti non responders a IFN piuttosto che dei responders [11, 13]. Peraltro esiste una relazione direttamente proporzionale tra i livelli d'espressione di IL-8 ed il *grading* istologico dell'ECA HCV-correlata, che come è noto, rappresenta un importante elemento predittivo negativo di risposta alla terapia interferonica [14]. Anche i livelli basali di TNF α sono risultati significativamente più bassi nei pazienti RS che non responders, suggerendo ciò come anche TNF α possa essere considerato un *marker* predittivo di risposta alla terapia [15].

Il nostro studio ha innanzitutto confermato i dati presenti in letteratura sul riscontro di livelli sierici di IL-8 significativamente più elevati nei soggetti con ECA HCV-correlata rispetto ai controlli sani [11]. Inoltre è stato dimostrato, in accordo con quanto sostenuto da altri Autori, che i livelli basali di IL-8 nei pazienti che svilupperanno una risposta sostenuta (RS) alla terapia interferonica sono significativamente più bassi che non responders (NR) [11-15]. Il nostro lavoro estende le osservazioni pregresse dimostrand

do come tale potere predittivo di IL-8 risulti mantenuto anche nel caso di terapia combinata con interferone pegilato e ribavirina. In realtà, la predittività di IL-8 è valida prevalentemente nel caso di mono-infezione da HCV, in accordo con quanto osservato da Blackard et al. nei pazienti con infezione HCV-HIV in cui i livelli di IL-8 non predicono la risposta biochimica e virologica al trattamento interferonico: ciò lascerebbe ipotizzare che i meccanismi di risposta alla terapia antivirale differiscono profondamente tra mono-infetti HCV e co-infetti HCV-HIV [16].

Infine, nel corso della terapia, i livelli sierici di IL-8 nei pazienti non responsivi e in coloro che recidivano non subiscono significative variazioni e si mantengono in tutte le rilevazioni più elevati di quelli dei pazienti responsivi, in cui, invece, le concentrazioni sieriche di IL-8 declinano costantemente durante il trattamento.

Risultati differenti sono stati riportati recentemente da Zekri et al.: costoro hanno infatti osservato livelli basali di IL-8 significativamente più elevati nei pazienti responsivi a PEG-Interferone e livelli di IL-8 progressivamente crescenti durante la terapia nei *non responders* [17]. Inoltre, nello studio di Zekri et al., i livelli di IL-8 *on-therapy* si mantengono stabili nei pazienti responsivi anziché declinare come nella nostra esperienza [17].

È possibile ipotizzare che, poichè NS5A esiste in vivo come quasispecie, diversi isolati di HCV possono indurre diversi livelli di produzione di IL-8 e dunque diversi gradi di risposta all'IFN ed in effetti, nello studio di Zekri quasi tutti i pazienti esaminati erano infettati da HCV genotipo 4 anziché dal genotipo 1 prevalente nella nostra casistica [11, 17].

Inoltre i due studi sono risultati divergenti sia nella definizione della risposta al trattamento, che nel nostro studio era rappresentata dalla risposta sostenuta e nello studio di Zekri era, invece, definita dalla risposta *end of treatment*, sia dal *timing* del campionamento che nello studio di Zekri aveva come estremo limite la fine della terapia mentre nella nostra indagine si spingeva fino alla conclusione del *follow-up* post-terapia.

In conclusione, il nostro studio dimostra come la determinazione dei livelli sierici di IL-8 possa rappresentare un importante *marker* non invasivo predittivo di risposta alla terapia combinata con PEG IFN + ribavirina nei pazienti affetti da ECA HCV-correlata.

Key words: IL-8, Peg-IFN, ribavirin, chronic hepatitis C.

RIASSUNTO

Sono stati misurati i livelli sierici di IL-8 in un gruppo di 44 pazienti affetti da Epatite Cronica Attiva (ECA) HCV+, all'inizio e al termine della terapia combinata con interferone pegilato e ribavirina. I valori di IL-8 sono stati confrontati con quelli misurati in un gruppo di controlli sani.

I pazienti sono stati trattati per 12 mesi e, successivamente, sono stati seguiti per 6 mesi in *follow-up* post-terapeutico. I livelli sierici di IL-8 sono stati misurati mediante test ELISA ad inizio e fine terapia e successivamente alla fine del *follow-up* post-trattamento. I livelli sierici basali di IL-8 nei pa-

zienti ECA HCV+ si sono dimostrati significativamente ($p < 0.01$) più elevati che nei controlli sani. Inoltre, nei pazienti che hanno successivamente documentato una risposta virologica sostenuta alla terapia (RS), i livelli di IL-8 hanno subito un declino *on treatment* e si sono mantenuti, in tutti i tempi di misurazione, significativamente più bassi rispetto a quelli dei pazienti non responsivi al trattamento (NR). L'IL-8 sierica può essere considerata e proposta come *marker* non invasivo e predittivo di risposta alla terapia combinata con PEG IFN α 2b + ribavirina.

SUMMARY

IL-8 serum levels were measured in a group of 44 patients affected with Chronic Active Hepatitis (CAH) HCV+ at the beginning and end of Peg-Interferon + Ribavirin combined therapy. IL-8 levels were compared with those measured in a group of healthy controls. The patients were treated for 12 months, and then followed up for 6 months after the end of the therapy. IL-8 serum levels were detected by ELISA at the beginning and end of the therapy, and then at the end of the follow-up. IL-

8 serum levels were significantly more elevated ($p < 0.01$) in CAH HCV+ patients than in the healthy controls. Furthermore, IL-8 serum levels in those patients who subsequently showed a sustained virological response to the therapy, declined on treatment and maintained lower levels than in those who did not respond to therapy. Serum IL-8 can be considered and proposed as a non-invasive and predictive marker of response to combined PEG IFN α 2b + Ribavirin in CAH HCV+.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Alter H.J. To C or not to C: these are the questions. *Blood* 85, 1681-1695, 1995.
- [2] McHutkinson J.G., Gordon S.C., Shiff E.R., et al. Interferonalpha-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* 339, 1485-1492, 1998.
- [3] Lam N.P., Neumann A.U., Gretch D.R., et al. Dose-dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology* 26, 226-231, 1997.
- [4] Lindsay K.L., Trepo C., Heintges T., et al. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b 31 to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 34, 395-403, 2001.
- [5] Neumann A.U., Lam N.P., Dahari H., et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alfa therapy. *Science* 282, 103-107, 1998.
- [6] Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., et al. Comparison of full length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J. Clin. Invest.* 96 (1), 224-230, 1995.
- [7] Witherell G.W., Beineke P. Statistical analysis of combined substitutions in non-structural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. *J. Med. Virol.* 63, 8-16, 2001.
- [8] Gale M.J., Korth M.J., Tang N.M., et al. Evidence that Hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the non-structural 5A protein. *Virology* 230, 217-227, 1997.
- [9] Gale M.J., Blakely C.M., Kwieciszewski B., et al. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanism of kinase regulation. *Mol. Cell Biol.* 18, 5208-5218, 1998.
- [10] Polyak S.J., Khabar K.S., Paschal D.M., et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* 75, 6095-6106, 2001.
- [11] Polyak S.J., Khabar K.S., Rezeiq M., Gretch D.R. Elevated levels of interleukine-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J. Virol.* 75, 6209-6211, 2001.
- [12] Koo B.C.A., Mc Poland P., Wagoner J.P., Kane O.J., Lohmann V., Polyak S.J. Relationships between Hepatitis C Virus replication and CXCL-8 production in vitro. *J. Virol.* 84, 7885-7893, 2006.

- [13] Bird G. Interleukin-8 in alcoholic liver disease. *Acta Gastroenterol. Belgium* 57, 255-259, 1994.
- [14] Shimoda K., Begum N.A., Shibuta K. et al. Interleukin-8 and hIRH (SDF1- α /PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 28(1), 108-115, 1998.
- [15] Neuman M.G., Benhamou J.P., Malkiewicz I.M., et al. Cytokines as predictors for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with chronic hepatitis C. *Clin. Biochem.* 34, 173-182, 2001.
- [16] Blackard J.T., Kang M., Sherman K.E., Koziel M.J., Peters M.G., Chung R.T. Effects of HCV treatment on cytokine expression during HCV-HIV coinfection. *J. Interferon Cytokine Res.* 26, 834-838, 2006.
- [17] Zekri A.R.N., Haleem H.A, Esmat G.E-D. et al. Immunomodulators, sFas and Fas-L as potential noninvasive predictors of IFN treatment in patients with HCV genotype-4. *J. Viral Hepatitis* 14, 468-477, 2007.