

ПРОФИЛЬ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

К.А. Сысоев¹, А.Б. Чухловин¹, Д.М. Шахманов², К.В. Жданов²,
Арег А. Тотолян³

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург

Резюме. Патогенез хронического гепатита С (ХГС) изучен недостаточно. Механизмы повреждения печеночной паренхимы при ХГС отличаются сложностью и разнообразием. Цитокинам отводится роль посредников в процессах фиброза и хронического воспаления. В настоящей работе с помощью мультиплексного анализа проведено исследование содержания 27 цитокинов в плазме крови 14 пациентов, страдающих ХГС. Пациентам была проведена биопсия печени, при которой определялась активность воспаления (индекс гистологической активности) и степень фиброза. В качестве контрольной группы изучены образцы плазмы крови 19 практически здоровых лиц. Определялись следующие цитокины: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, эотаксин, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, PDGF-BB, TNF α и VEGF. У пациентов с ХГС было выявлено повышенное по сравнению с контрольной группой содержание в плазме крови IL-1ra, IL-6, IL-7, IFN γ , IL-12(p70), IL-4, IL-9, IL-8, IP-10, эотаксина, MCP-1, MIP-1 β , TNF α , G-CSF и GM-CSF. Уровни FGF-2 и PDGF-BB у пациентов с ХГС были снижены по сравнению с контролем. В зависимости от генотипа вируса гепатита С (3a и 1b), индекса гистологической активности в ткани печени и степени фиброза были выявлены различия в продукции IL-1ra, IL-6, IL-7, IFN γ , IL-12(p70), IL-4, IL-9, IL-8, IP-10, эотаксина, MCP-1, MIP-1 β , TNF α , G-CSF и GM-CSF. Выявленные изменения уровня цитокинов в плазме крови у пациентов с ХГС характеризуют различную направленность регуляторных нарушений, что характеризует ХГС как иммунопатологический процесс.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, фиброз печени, цитокины, хемокины.

CYTOKINES AND CHEMOKINES IN THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Sysyoev K.A., Chukhlovina A.B., Shakhmanov D.M., Zhdanov K.V., Totolian Areg A.

Abstract. Pathogenesis of chronic hepatitis C (CHC) remains to be determined. Mechanisms of liver parenchyma damage in patients with CHC are complex and different. Cytokines play the role of intermediaries in the process of fibrosis development and chronic inflammation. In the present study levels of 27 cytokines in the blood plasma of 14 patients with CHC were tested using multiplex analysis. The liver biopsy was performed in all patients to define the activity of inflammation (histological activity index) and the degree of fibrosis. Nineteen samples of blood plasma obtained from healthy individuals were served as a control group in this study. The following cytokines were measured: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, PDGF-BB, TNF α and VEGF. In patients with CHC elevated levels of plasma IL-1ra, IL-6, IL-7, IFN γ , IL-12 (p70), IL-4, IL-9, IL-8, IP-10, eotaxin, MCP-1, MIP-1 β , TNF α , G-CSF and GM-CSF were found in compare with the control group.

поступила в редакцию 28.08.2012
отправлена на доработку 31.08.2012
принята к печати 03.09.2012

Адрес для переписки:

Сысоев Кирилл Александрович,
к.м.н., старший научный сотрудник
НМЦ по молекулярной медицине МЗ РФ
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова

197022, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6/8,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.
Тел.: +7 921 363-81-64 (моб.).
E-mail: ksysysoev@mail.ru

© Сысоев К.А. и соавт., 2013

At the same time levels of FGF-2 and PDGF-BB were reduced in patients with CHC in compare with controls. Differences in the production of IL-1ra, IL-6, IL-7, IFN γ , IL-12 (p70), IL-4, IL-9, IL-8, IP-10, eotaxin, MCP-1, MIP-1 β , TNF α , G-CSF and GM-CSF were depend on the genotype of HCV (3a or 1b), histological activity index in liver tissue and the degree of liver fibrosis. The revealed changes of cytokine production in patients with CHC characterize different orientation of regulatory violations confirming that CHC is an immunopathological process. (*Infekc. immun.*, 2013, vol. 3, N 1, p. 49–58)

Key words: chronic viral hepatitis C, liver fibrosis, cytokines, chemokines.

Введение

Хронический характер течения гепатита С (ХГС) связан с персистенцией вируса гепатита С (ВГС) в пораженных тканях вследствие недостаточной противовирусной активности клеточного иммунитета хозяина. Описаны количественные и качественные дефекты противовирусного иммунного ответа. Так, специфичные в отношении ВГС CD8⁺ Т-лимфоциты не отвечают на вирусные антигены и поэтому не продуцируют в достаточных количествах цитокины IL-2 и TNF α , обладающие выраженными противовирусными и иммуностимулирующими эффектами [26].

Фибротическое перерождение ткани печени является обычным осложнением ХГС. Показано, что трансформация клеток Ито в миофибробласты под воздействием TNF α является следствием продукции данного цитокина в ответ на инфильтрацию печени лимфоцитами и моноцитами [33]. Роль TNF α в развитии фиброза печени противоречива: с одной стороны TNF α необходим для естественной пролиферации гепатоцитов в период регенерации печени [12], с другой стороны TNF α обладает выраженным гепатотоксическим действием, что показано в экспериментальных и клинических исследованиях [27]. Важным аспектом противовирусной защиты организма является активация Toll-подобных рецепторов (TLR), что в конечном счете может приводить к активации генов цитокинов и повышению их продукции [37].

Целью нашего исследования было изучение уровня ряда про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови у больных ХГС. Результаты работы подтвердили наличие системной активации провоспалительного комплекса цитокинов и хемокинов у больных ВГС, уровень которой коррелирует с клинической стадией заболевания.

Материалы и методы

Все пациенты в связи с обнаружением в крови анти-НСV антител поступали в клинику инфекционных болезней ВМедА им. С.М. Кирова для углубленного обследования.

Комплексное клинико-лабораторное обследование включало в себя: клинический осмотр больного по органам и системам, общеклинические анализы крови и мочи, биохимическое исследование крови, исследование крови на специфические маркеры вирусных гепатитов методом ИФА, молекулярно-биологическое исследование крови с использованием ПЦР для оценки качественного и количественного содержания РНК ВГС и его генотипирования, ультразвуковое обследование органов брюшной полости, пункционную биопсию печени с последующим гистологическим исследованием гепатобиоптатов.

Диагноз хронического вирусного гепатита С был основан на выявлении анти-НСV антител методом ИФА и РНК ВГС в плазме крови методом ПЦР, а также наличии фиброза печени при морфологическом исследовании гепатобиоптата.

Аспирационная пункционная биопсия печени по Менгени проводилась во время стационарного обследования после получения информированного согласия пациента, а также после изучения функции системы гемостаза и УЗИ органов брюшной полости. Активность и стадия патологического процесса в печени оценивались полуколичественно. Для этого использовался индекс гистологической активности (ИГА), предложенный R.G. Knodell [17]. Для диагностики стадии патологического процесса применялся индекс фиброза в соответствии со шкалой оценок «METAVIR» [4]. По этим классификациям различают гепатит с минимальной активностью (ИГА 1–3 балла), со слабо выраженной активностью (ИГА 4–8 баллов), с умеренной активностью (ИГА 9–12 баллов) и с выраженной активностью (ИГА 13–18 баллов), а также степень фиброза (отсутствие, слабый, умеренный, тяжелый и цирроз).

Больные с острым вирусным гепатитом С, пациенты на стадии цирроза печени, а также лица с алкоголизмом и наркоманией в исследование не включались. Исключались другие заболевания печени (вирусные, аутоиммунные, метаболические, токсические). На основании обследования была сформирована основ-

ная группа пациентов с верифицированным ВГС — 6 мужчин и 8 женщин (средний возраст $33,9 \pm 10,7$ лет). По генотипу вируса распределение было следующим: 1b — 5, 3a — 9 пациентов. Индекс гистологической активности варьировал от 2 до 7 баллов, степень фиброза — от 1 до 3. Контрольную группу составили 19 практически здоровых лиц сходного пола и возраста.

Цитокины определялись с помощью мультиплексного анализа на установке «Bio-Plex 200» (Bio-Rad, США). Данный метод представляет собой мультиплексную иммунную реакцию, протекающую на микрочастицах, с их последующим проточным флуоресцентным анализом и одновременным определением содержания многих специфических белков. Пользовались стандартной панелью на 27 цитокинов. Плазму крови, стабилизированную ЭДТА, вносили в лунки планшета. Дальней-

шие этапы диагностики выполняли согласно инструкции производителя модели прибора «Bio-Plex 200».

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Для оценки выборок использовались методы непараметрической статистики, в том числе корреляционный анализ по критерию Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Изменения уровней цитокинов в плазме крови при ХГС

В табл. 1 продемонстрированы медианы выборок значения содержания цитокинов в плазме крови у пациентов с ХГС по сравнению с практически здоровыми лицами.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ХГС ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЕМ

Показатель	Контроль (пг/мл), n = 19			ХГС (пг/мл), n = 14			p
	1 квартиль	3 квартиль	Медиана	1 квартиль	3 квартиль	Медиана	
IL-1 β	0,00	0,21	0,08	0,00	3,36	1,00	0,284
IL-1ra	0,00	114,85	74,45	99,24	685,13	242,88	0,003
IL-2	0,00	2,67	0,86	0,00	20,78	3,21	0,284
IL-4	0,00	1,35	0,87	3,54	7,31	5,23	< 0,0001
IL-5	0,00	0,69	0,11	0,00	1,01	0,00	0,328
IL-6	1,56	2,68	2,21	5,81	12,47	9,31	< 0,0001
IL-7	0,33	6,62	4,79	8,43	38,60	21,87	< 0,0001
IL-9	0,00	0,00	3,11	7,65	26,13	12,42	< 0,0001
IL-10	0,00	1,32	0,54	0,14	3,11	1,30	0,088
IL-12(p70)	1,37	3,19	2,28	5,35	20,72	10,66	0,001
IL-13	0,00	0,00	1,45	9,23	50,38	42,71	< 0,0001
IL-15	2,65	4,12	3,45	0,00	6,96	0,00	0,088
IL-17	0,00	4,21	7,13	0,02	16,47	8,85	0,175
CCL2/MCP-1	0,00	0,13	0,08	59,24	122,03	84,73	< 0,0001
CCL3/MIP-1 α	3,19	5,55	4,51	3,21	10,54	7,82	0,138
CCL4/MIP-1 β	4,59	13,13	8,99	18,58	28,63	22,80	< 0,0001
CCL5/RANTES	143,55	1294,56	150,28	3568,41	19465,49	8661,60	< 0,0001
CCL11/эотаксин	0,00	9,32	6,68	29,77	74,58	57,85	< 0,0001
CXCL8/IL-8	0,00	1,19	0,52	12,19	25,26	19,87	< 0,0001
CXCL10/IP-10	3,51	49,83	32,44	121,14	378,55	284,56	< 0,0001
FGF-2	0,00	16,19	9,26	0,00	0,00	0,00	0,001
PDGF-BB	201,46	976,71	507,11	57,86	279,70	162,81	0,009
G-CSF	0,00	15,70	11,81	76,14	189,08	151,60	< 0,0001
GM-CSF	3,12	7,73	4,14	7,99	33,22	14,24	0,005
VEGF	4,65	9,12	6,56	13,76	35,58	30,23	0,914
IFN γ	0,90	4,49	14,22	1,00	9,51	5,51	< 0,0001
TNF α	4,78	18,95	15,67	29,84	79,07	50,53	< 0,0001

При анализе этих данных обращают на себя внимание изменения уровней как провоспалительных цитокинов, так и противовоспалительных белковых факторов, действующих в различных фазах иммунного ответа. Так, целый ряд цитокинов способствует созреванию и функционированию отдельных иммунных популяций. В частности, G-CSF и GM-CSF — гемопоэтические колониестимулирующие факторы — обладают выраженным эффектом в отношении созревания гранулоцитов и моноцитов. У пациентов с ХГС содержание GM-CSF и G-CSF в плазме крови были выше чем в контрольной группе ($p < 0,001$). IL-4 является важным цитокином, обеспечивающим созревание и дифференцировку дендритных клеток. Его уровень у пациентов с ХГС был значительно выше, чем в контроле ($p < 0,001$). Другой цитокин, IL-7, обеспечивает пролиферацию и последующую дифференцировку стволовых клеток в лимфоидные предшественники, а также процессы «созревания» Т-клеток в тимусе. Уровень IL-7 в группе пациентов с ХГС также был повышен по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Наконец, IL-12(p70) является провоспалительным цитокином, который продуцируется моноцитами/макрофагами и дендритными клетками и играет важную роль в сопряжении систем врожденного и приобретенного иммунитета, регулируя Th1-ответ. Уровень IL-12 в нашем исследовании был выше у ВГС-

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ УРОВНЕМ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ И СТЕПЕНЬЮ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ ПРИ ВГС (ПО КРИТЕРИЯМ «METAVIR»)

Цитокин/степень фиброза печени	r	p
IL-1ra	0,55	0,043
IL-4	0,59	0,028
IL-6	0,55	0,040
IL-7	0,54	0,045
IL-9	0,57	0,032
IL-10	0,59	0,027
IL-12(p70)	0,61	0,021
CCL11/эотаксин	0,59	0,026
CCL3/MIP-1 α	0,64	0,013
G-CSF	0,61	0,020
GM-CSF	0,58	0,031
VEGF	0,69	0,007
IFN γ	0,56	0,037
TNF α	0,59	0,027

инфицированных пациентов по сравнению с контрольной группой ($p = 0,001$). К числу факторов функционального созревания клеточного иммунного ответа относят IFN γ — один из основных факторов дифференцировки иммунного ответа по Th1-типу. У пациентов с ХГС наблюдалось повышение содержания IFN γ в плазме крови по сравнению с практически здоровыми лицами ($p < 0,001$).

Содержание IL-6 и TNF α в группе пациентов с ХГС было существенно выше, чем в контроле ($p < 0,001$). IL-1ra является противовоспалительным фактором, блокирующий активность IL-1 путем связывания рецептора. Его уровни также были повышены у пациентов с ХГС по сравнению с контролем ($p = 0,003$), что может отражать ингибирующий эффект в отношении IL-1.

Хемокины относятся к факторам иммунного ответа, опосредующим миграцию клеток при воспалении и их избирательное оседание в тканях. Среди прочих хемокинов были также CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/эотаксин, CXCL8/IL-8 и CXCL10/IP-10, обеспечивающие транзит клеток в норме и привлечение лейкоцитов в очаг воспаления при патологии. В нашем исследовании уровни CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/эотаксин, IL-8/CXCL8 и CXCL10/IP-10 у пациентов с ХГС были повышены по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Цитокин IL-9, помимо вовлечения в развитие Th2-типа иммунного ответа, ассоциирован с развитием аутоиммунных нарушений. В нашем исследовании у пациентов с ХГС содержание IL-9 было выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$), что может отражать повышенный риск развития аутоагрессивных иммунных реакций при ХГС.

IL-10 принято считать классическим Th2-цитоксином, обладающим выраженным противовоспалительным эффектом. В нашей работе не выявлено достоверного повышения IL-10 при ХГС.

Кроме того, мы определяли содержание FGF-2, PDGF-BB и VEGF — ростовых факторов, стимулирующих пролиферацию мезенхимных клеток и фиброгенез в печени. Интересно, что по нашим данным, концентрации FGF-2 и PDGF-BB у пациентов с ХГС были ниже, чем у практически здоровых лиц ($p = 0,001$ и $0,009$ соответственно). Среди факторов развития фиброза печени следует также отметить IL-13 — цитокин, обеспечивающий ответ по Th2-типу иммунного ответа. В группе ХГС уровень IL-13 был выше чем в контроле ($p < 0,001$).

Возможные взаимосвязи между уровнями цитокинов и развитием фиброза печени

В табл. 2 представлены корреляции между содержанием цитокинов в плазме крови и степенью фиброза печени у пациентов с ХГС.

В группе показателей, отражающих созревание иммунных популяций, наблюдалась положительная взаимосвязь между концентрацией IL-7 и степенью фиброза печени ($r = 0,54$; $p = 0,045$). Также была отмечена положительная взаимосвязь между степенью фиброза и содержанием IL-4 ($r = 0,59$; $p = 0,028$), участвующего в дифференцировке дендритных клеток. Кроме того, наблюдалась положительная корреляция между уровнями колониестимулирующих факторов (G-CSF, GM-CSF) и степенью фиброза печени ($r = 0,61$ при $p = 0,020$ и $r = 0,58$ при $p = 0,031$ соответственно), что может свидетельствовать об усиленном миелопоэзе как факторе, способствующем воспалительным процессам при хроническом гепатите С. Также была обнаружена корреляция между уровнями IL-12, IFN γ и степенью фиброза печени (соответственно $r = 0,56$; $p = 0,02$ и $r = 0,61$; $p = 0,04$), возможно, отражающая усиление кооперации различных звеньев клеточного иммунитета при прогрессировании ВГС.

У обследованных пациентов была выявлена положительная корреляция между уровнями IL-6 и TNF α в плазме крови и степенью фиброза печени (соответственно $r = 0,55$; $p = 0,04$ и $r = 0,59$; $p = 0,03$), что подтверждает значимость общего фона провоспалительных цитокинов в генезе фибротического процесса. Кроме того, наблюдалась положительная корреляция между содержанием IL-1ra в плазме и степенью фиброза печени ($r = 0,55$; $p = 0,04$).

Значения концентраций CCL11/эотаксин и CCL3/MIP-1 α находились в прямой зависимости от степени фиброза печени ($r = 0,59$; $p = 0,03$ и $r = 0,64$; $p = 0,013$ соответственно).

Также была обнаружена прямая корреляционная связь между уровнем IL-9 и степенью фиброза печени ($r = 0,57$; $p = 0,03$), что предполагает возможную роль данного цитокина как фактора развития аутоиммунных состояний при ХГС.

Положительная взаимосвязь между содержанием IL-10 в плазме крови и степенью фиброза печени ($r = 0,59$ при $p = 0,027$), вероятно обусловлена его иммуносупрессивными эффектами в клинических исходах заболевания.

В то же время уровень VEGF положительно коррелировал со степенью фиброза печени ($r = 0,69$; $p = 0,007$), что может говорить о его патогенетической роли в неангиогенезе, при вирусной инфекции.

Обсуждение

Полученные в настоящей работе результаты основаны на обследовании небольшой группы больных с верифицированным хроническим гепатитом С. В табл. 3 обобщены основные изменения иммунорегуляторных факторов в плазме крови у больных ХГС.

Разнообразие изменений в содержании цитокинов у пациентов с ХГС свидетельствует о выраженности регуляторных нарушений иммунитета при данной патологии. Повышение IL-1ra у пациентов с ХГС вероятно связано с активацией противовоспалительной активности по нейтрализации действия IL-1 β при хроническом воспалительном процессе. По литературным данным повышение концентрации IL-1ra у пациентов с ХГС ассоциировано с развитием у них криоглобулинемии смешанного типа, а также неходжкинских лимфом [20]. Обнаруженная нами взаимосвязь между степенью фиброза печени и содержанием IL-1ra в плазме крови у ВГС-инфицированных пациентов свидетельствует о вкладе аутоиммунных нарушений в формирование тканевой перестройки печени в данной клинической группе. IL-4, согласно недавним исследованиям [8], помимо хорошо известных свойств индуктора Th2-типа иммунного ответа, обладает выраженным эффектом в отношении дендритных клеток, обеспечивая продукцию ими RELM α и Ym1/2. RELM α (резистин-подобная молекула α) снижает толерантность к глюкозе, а Ym1/2 — лектин, альтернативно активирует макрофаги [8]. Функция плазмоцитойдных дендритных клеток страдает при хронической ВГС-инфекции, поэтому повышение IL-4 можно рассматривать как компенсаторный эффект недостаточной активности дендритных клеток. Положи-

ТАБЛИЦА 3. ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХГС ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЕМ

Повышены ($p < 0,01$)	Понижены ($p < 0,01$)	Не изменены
IL-1ra	FGF-2	IL- β
IL-4	PDGF-BB	IL-2
IL-6		IL-5
IL-7		IL-10
CXCL8/IL-8		IL-15
IL-9		IL-17
IL-12(p70)		VEGF
IL-13		CCL3/MIP-1 α
IFN γ		
TNF α		

тельную взаимосвязь между содержанием IL-4 и степенью фиброза печени можно трактовать как вклад Th2-ответа в активацию звездчатых клеток — основных продуцентов коллагена в печени [30].

Повышение значений IL-7 у пациентов с ХГС может способствовать активации факторов дифференцировки лимфоидных предшественников на фоне ослабления противовирусного иммунитета. Согласно L. Golded-Mason и соавт. недостаточность α -цепи рецептора IL-7 (CD127) приводит к хронизации процесса у ВГС-инфицированных лиц [13]. Неэффективность системы IL-7/IL-7R отражается на повышении содержания IL-7 в плазме крови пациентов с ХГС в нашем исследовании. Прямая корреляция между уровнем IL-7 и степенью фиброза печени свидетельствует о прогрессировании фиброгенеза вследствие несовершенства взаимодействия лиганда и рецептора.

IL-9 относят к цитокинам, связанным с Th2-, Th17- и Treg-типами иммунного ответа [14]. Некоторые авторы отличают специфичный Th9-тип ответа [14, 24]. Повышение содержания IL-9 у пациентов с ХГС, а также корреляцию уровня данного цитокина и степени фиброза печени можно трактовать как вовлечение в процесс хронического воспаления всех перечисленных типов иммунного ответа.

Из экспериментальных исследований известно, что IL-10 обладает антифибротическим действием в отношении печени [41]. В нашем исследовании корреляцию между уровнем фиброза печени и содержанием IL-10 в плазме крови можно объяснить компенсаторным действием данного цитокина, направленным на торможение процессов фиброза у пациентов с ХГС.

IL-12 — ключевой цитокин, ответственный за развитие Th1-типа иммунного ответа. Согласно литературным данным при ВГС-инфекции продукция IL-12 снижается [7, 22, 39]. В нашем исследовании, наоборот, содержание IL-12(p70) в плазме крови больных было выше, чем в контроле, а также наблюдалась прямая корреляция между степенью фиброза и уровнем IL-12(p70). Повышение содержания IL-13 в плазме крови пациентов с ХГС объясняется активацией Th2-типа иммунного ответа, а корреляция с фиброзом — профибротическим действием цитокина [37].

В настоящем исследовании у пациентов с ХГС в плазме крови уровни CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/эотаксин, CXCL8/IL-8 и CXCL10/IP-10 были достоверно выше, чем в контрольной группе. Данные субстанции относятся к хемоки-

нам (хемотактическим цитокинам), играющим в патогенезе ХГС существенную роль. Так, CCL2/MCP-1 обеспечивает привлечение моноцитов в очаги повреждения либо воспаления [40]. Кроме того CCL2/MCP-1 является хемоаттрактантом для клеток Ито (звездчатых клеток) — основных продуцентов коллагена в печени [21]. В проведенных ранее исследованиях нами было показано достоверное увеличение уровня мРНК CCL2/MCP-1 в печени пациентов с ХГС в зависимости от степени фиброза [1]. В настоящем исследовании наблюдалась прямая корреляция между уровнем CCL2/MCP-1 в плазме крови и степенью фиброза печени. Таким образом, весьма обоснованно считать CCL2/MCP-1 маркером состояния печени при ХГС. CCL11/эотаксин действует через рецептор CCR3 и обладает активностью в отношении клеток, несущих данный рецептор. Согласно F. Tacke и соавт. [31] у пациентов с хроническими заболеваниями печени уровень CCL11/эотаксин в плазме крови коррелировал с клиническими, лабораторными и морфологическими показателями за шестилетний период наблюдений. Высокий уровень CCL11/эотаксин трактовался авторами как неблагоприятный прогностический признак. В нашей работе уровень CCL11/эотаксин у пациентов с ХГС превышал контрольные значения, а также коррелировал со степенью фиброза, что подтверждает участие хемокина в патогенезе хронической ВГС-инфекции. Уровень CCL4/MIP-1 β у пациентов с ХГС был выше чем в контроле, а содержание CCL3/MIP-1 α коррелировало со степенью фиброза печени. Опубликованы данные о повышении уровней CCL3/MIP-1 α и CCL4/MIP-1 β в сыворотке крови ВГС-инфицированных (продуцентами являются эндотелиальные клетки, гепатоциты и эпителий желчевыводящих путей) [3, 18]. Однако A. Vargas и соавт. у пациентов, инфицированных ВГС, не выявили корреляций между уровнем фиброза печени и концентрацией широкого спектра хемокинов, включающего CCL11/эотаксин, CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CXCL1/GRO- α , CXCL5/ENA-78 [35]. Возможно подобная картина наблюдалась вследствие наличия у обследованных пациентов коинфекции ВИЧ.

CCL5/RANTES является хемокином, ответственным за привлечение активированных Т-лимфоцитов. В настоящем исследовании уровень CCL5/RANTES в плазме крови пациентов с ХГС достоверно превышал контрольные значения, также отмечалась прямая взаимосвязь между содержанием данного хемокина и степе-

нию фиброза печени. Согласно G.A. Tawadrous и соавт. уровень CCL5/RANTES у пациентов с ХГС повышается и коррелирует с вирусной нагрузкой, в результате чего авторами делается вывод о существенном вкладе хемокина в повреждение гепатоцитов при ХГС. В проведенных ранее исследованиях [1] нами установлено, что содержание в лейкоцитах крови мРНК хемокиновых рецепторов CCR1 (лиганды CCL3/MIP-1 α и CCL5/RANTES), CCR2 (CCL2/MCP-1), CCR3 (CCL5/RANTES и CCL11/эотаксин) и CCR5 (CCL5/RANTES и CCL4/MIP-1 β) было существенно снижено ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. При сопоставлении этих изменений с уровнями CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES и CCL11/эотаксин в плазме крови пациентов с ХГС можно заключить, что сниженная экспрессия мРНК хемокиновых рецепторов приводит к последующему повышению продукции соответствующих хемокинов. Итогом данного нарушения является избыточная активация взаимодействия рецептор—лиганд, вследствие чего у пациентов с ХГС прогрессирует аутоагрессия лейкоцитов против клеток печени. Повышенный уровень CXCL8/IL-8 в группе ХГС объясняется тем, что указанный хемокин индуцируется белком ВГС NS5A [5], а также репликацией ВГС [15]. Активность CXCL8/IL-8 не только в отношении нейтрофилов, но и Т-лимфоцитов подтверждает роль данного хемокина в патогенезе ХГС. Содержание CXCL10/IP-10 при ВГС-инфекции повышается как в периферической крови, так и внутрипеченочно [25, 28]. Продукентами CXCL10/IP-10 являются гепатоциты и эндотелиальные клетки синусоидов [28]. Рецептором CXCL10/IP-10 является CXCR3, специфичный для Т-лимфоцитов. Показано, что при ВГС-инфекции Т-лимфоциты, инфильтрирующие печень, экспрессируют CXCR3, что подтверждает активную роль CXCL10/IP-10 в патогенезе заболевания.

Персистенция вируса по данным ряда авторов [19, 29] приводит к неспецифической инфильтрации печени CD8⁺ лимфоцитами. Опубликованы данные о положительной корреляции между уровнем воспаления в печени и экспрессией CCR5 и CXCR3 (рецепторов RANTES) на Т-лимфоцитах [18]. Разнообразие обнаруженных нами нарушений содержания в плазме крови цитокинов характеризует противовирусный иммунный ответ при ХГС как ослабленный, сопровождающийся повышенной продукцией цитокинов как Th1-, так и Th2-типа.

Важной особенностью ВГС-инфекции является осложнения в виде криоглобулинеми-

ческих поражений кожи, почек и суставов [6]. В исследовании A. Antonelli и соавт. [2] обнаружено повышение IL-1 β , IL-6 и TNF α в сыворотке крови у пациентов с ХГС, осложненным криоглобулинемией, по сравнению с ВГС-положительной группой без осложнений. По нашим данным уровни IL-6 и TNF α в плазме у пациентов с ХГС повышены по сравнению с контролем. IL-6 — цитокин, стимулирующий дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки [16]. Указанный эффект индуцируется IL-1 β и TNF α . Таким образом, одной из возможных причин развития криоглобулинемии у пациентов с ХГС является повышенная активность IL-6.

ВГС-инфекция по данным ряда авторов ухудшает «созревание» и функцию дендритных клеток [10, 32]. В настоящем исследовании уровни колониестимулирующих факторов G-CSF и GM-CSF у пациентов с ХГС были выше, чем в контроле, также наблюдалась положительная корреляция между содержанием указанных цитокинов и степенью фиброза печени. GM-CSF является мощным стимулятором трансформации моноцитов в дендритные клетки [36]. Одним из клинических проявлений ХГС является нейтропения [34], поэтому повышение содержания G-CSF (основного ростового фактора для нейтрофилов) вероятно носит компенсаторный характер. Следствием повышенной активности колониестимулирующих факторов в печени является стимуляция клеток Купфера и клеток Ито, что приводит к запуску процессов фиброза. У пациентов с ХГС наблюдалось снижение уровня ростовых факторов FGF-2 и PDGF-BB в плазме крови, что является неожиданностью, так как процессы фиброза в целом по группе активированы значительно. Подобный результат можно объяснить наличием не вполне ясных механизмов подавления продукции ростовых факторов на системном уровне, приводящих к замедлению фиброза печени при ХГС.

Заключение

Проблемы диагностики и современного лечения ХГС обусловлены постепенным развитием клинических нарушений и частым отсутствием изменений клинико-лабораторных показателей, традиционно используемых для диагностики заболеваний печени (желтуха, повышение уровня трансаминаз и билирубина). Проведенное исследование подтверждает многообразие иммунных нарушений при ХГС, в том числе в связи с развитием фиброза печени. Показаны основные изменения содер-

жания цитокинов и хемокинов в плазме крови больных ХГС, которые отражают следующие патологические процессы:

- увеличение содержания факторов гемопоэза и созревания иммунных субпопуляций G-CSF, GM-CSF, IL-4, IL-7;
- повышение уровней провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6 и TNF α);
- повышение концентраций ряда хемокинов, в особенности CCL11/эотаксин и CCL3/MIP-1 α .

Обнаруженные изменения содержания в плазме крови провоспалительных цитокинов, факторов дифференцировки Th-ответа, ростовых факторов, противовоспалительных цитокинов и хемокинов, изложенные в данной работе, делает обоснованным дальнейший отбор потенциальных лабораторных показателей для уточненной диагностики ХГС.

Список литературы

1. Жданов К.В., Гусев Д.А., Чирский В.С., Сысов К.А., Якубовская Л.А., Шахманов Д.М., Тотолян Арег А. Экспрессия хемокинов и их рецепторов в крови и ткани печени при хроническом вирусном гепатите С // *Медицинская иммунология*. — 2007. — Т. 9, № 4–5. — С. 379–388.
2. Antonelli A., Ferri C., Ferrari S.M., Ghiri E., Goglia F., Pampana A., Bruschi F., Fallahi P. Serum levels of proinflammatory cytokines interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha in mixed cryoglobulinemia // *Arthritis Rheum.* — 2009. — Vol. 60. — P. 3841–3847.
3. Apolinario A., Diago M., Lo Iacono O., Lorente R., Pérez C., Majano P.L., Clemente G., García-Monzón C. Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy // *Aliment. Pharmacol. Ther.* — 2004. — Vol. 19. — P. 551–562.
4. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group // *Hepatology*. — 1996. — Vol. 24. — P. 289–293.
5. Bonte D., Francois C., Castelain S., Wychowski C., Dubuisson J., Meurs E.F., Duverlie G. Positive effect of the hepatitis C virus nonstructural 5A protein on viral multiplication // *Arch. Virol.* — 2004. — Vol. 149. — P. 1353–1371.
6. Charles E.D., Dustin L.B. Hepatitis C virus-induced cryoglobulinemia // *Kidney Int.* — 2009. — Vol. 76. — P. 818–824.
7. Ciesek S., Liermann H., Hadem J., Greten T., Tillmann H.L., Cornberg M., Aslan N., Manns M.P., Wedemeyer H. Impaired TRAIL-dependent cytotoxicity of CD1c-positive dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection // *J. Viral. Hepat.* — 2008. — Vol. 15. — P. 200–211.
8. Cook P.C., Jones L.H., Jenkins S.J., Wynn T.A., Allen J.E., MacDonald A.S. Alternatively activated dendritic cells regulate CD4⁺ T-cell polarization in vitro and in vivo // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2012. — Vol. 109. — P. 9977–9982.
9. Della Bella S., Crosignani A., Riva A., Presicce P., Benetti A., Longhi R., Podda M., Villa M.L. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4⁺ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection // *Immunology*. — 2007. — Vol. 121. — P. 283–292.
10. Dental C., Florentin J., Aouar B., Gondois-Rey F., Durantel D., Baumert T.F., Nunes J.A., Olive D., Hirsch I., Stranska R. Hepatitis C virus fails to activate NF- κ B signaling in plasmacytoid dendritic cells // *J. Virol.* — 2012. — Vol. 86. — P. 1090–1096.
11. Douglas M.W., George J. Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic hepatitis C // *World J. Gastroenterol.* — 2009. — Vol. 15. — P. 4356–4364.
12. Fujiyoshi M., Ozaki M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases // *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* — 2011. — Vol. 18. — P. 13–22.
13. Golden-Mason L., Burton J.R. Jr., Castelblanco N., Klarquist J., Benlloch S., Wang C., Rosen H.R. Loss of IL-7 receptor alpha-chain (CD127) expression in acute HCV infection associated with viral persistence // *Hepatology*. — 2006. — Vol. 44. — P. 1098–1109.
14. Goswami R., Kaplan M.H. A brief history of IL-9 // *J. Immunol.* — 2011. — Vol. 186. — P. 3283–3288.
15. Green J., Khabar K.S., Koo B.C., Williams B.R., Polyak S.J. Stability of CXCL-8 and related AU-Rich mRNAs in the context of hepatitis C virus replication in vitro // *J. Infect. Dis.* — 2006. — Vol. 193. — P. 802–811.
16. Hirano T., Taga T., Nakano N., Yasukawa K., Kashiwamura S., Shimizu K., Nakajima K., Pyun K.H., Kishimoto T. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1985. — Vol. 82. — P. 5490–5494.
17. Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C., Chen T.S., Craig R., Kaplowitz N., Kiernan T.W., Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis // *Hepatology* — 1981. — Vol. 1. — P. 431–435.
18. Larrubia J.R., Calvino M., Benito S., Sanz-de-Villalobos E., Perna C., Pérez-Hornedo J., González-Mateos F., García-Garzón S., Bienvenido A., Parra T. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8⁺ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection // *J. Hepatol.* — 2007. — Vol. 47. — P. 632–641.
19. Leroy V., Vigan I., Mosnier J.F., Dufeu-Duchesne T., Pernollet M., Zarski J.P., Marche P.N., Jouvin-Marche E. Phenotypic and functional characterization

- of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C // *Hepatology*. — 2003. — Vol. 38. — P. 829–841.
20. Libra M., Mangano K., Anzaldi M., Quattrocchi C., Donia M., di Marco R., Signorelli S., Scalia G., Zignego A.L., de Re V., Mazzarino M.C., Nicoletti F. Analysis of interleukin (IL)-1 β IL-1 receptor antagonist, soluble IL-1 receptor type II and IL-1 accessory protein in HCV-associated lymphoproliferative disorders // *Oncol. Rep.* — 2006. — Vol. 15. — P. 1305–1308.
 21. Marra F., Romanelli R.G., Giannini C., Failli P., Pastacaldi S., Arrighi M.C., Pinzani M., Laffi G., Montalto P., Gentilini P. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells // *Hepatology*. — 1999. — Vol. 29. — P. 140–148.
 22. Mengshol J. A., Golden-Mason L., Castelblanco N., Im K.A., Dillon S.M., Wilson C.C., Rosen H.R.; Virahep-C Study Group. Impaired plasmacytoid dendritic cell maturation and differential chemotaxis in chronic hepatitis C virus: associations with antiviral treatment outcomes // *Gut*. — 2009. — Vol. 58. — P. 964–973.
 23. Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation // *Int. J. Hematol.* — 2000. — Vol. 72. — P. 391–398.
 24. Nowak E.C., Noelle R.J. Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine // *Immunology*. — 2010. — Vol. 131. — P. 169–173.
 25. Patzwahl R., Meier V., Ramadori G., Mihm S. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization // *J. Virol.* — 2001. — Vol. 75. — P. 1332–1338.
 26. Rodrigue-Gervais I.G., Rigsby H., Jouan L., Sauvé D., Sékaly R.P., Willems B., Lamarre D. Dendritic cell inhibition is connected to exhaustion of CD8⁺ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C virus infection // *J. Immunol.* — 2010. — Vol. 184. — P. 3134–3144.
 27. Schwabe R.F., Brenner D.A. Mechanisms of liver injury. I. TNF α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2006. — Vol. 290. — P. G583–G589.
 28. Shields P.L., Morland C.M., Salmon M., Qin S., Hubscher S.G., Adams D.H. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 163. — P. 6236–6243.
 29. Sprengers D., van der Molen R.G., Kusters J.G., Kwekkeboom J., van der Laan L.J., Niesters H.G., Kuipers E.J., De Man R.A., Schalm S.W., Janssen H.L. Flow cytometry of fineneedle-aspiration biopsies: a new method to monitor the intrahepatic immunological environment in chronic viral hepatitis // *J. Viral. Hepat.* — 2005. — Vol. 12. — P. 507–512.
 30. Sugimoto R., Enjoji M., Nakamuta M., Ohta S., Kohjima M., Fukushima M., Kuniyoshi M., Arimura E., Morizono S., Kotoh K., Nawata H. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells // *Liver Int.* — 2005. — Vol. 25. — P. 420–428.
 31. Tacke F., Trautwein C., Yagmur E., Hellerbrand C., Wiest R., Brenner D.A., Schnabl B. Up-regulated eotaxin plasma levels in chronic liver disease patients indicate hepatic inflammation, advanced fibrosis and adverse clinical course // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2007. — Vol. 22. — P. 1256–1264.
 32. Takaki A., Tatsukawa M., Iwasaki Y., Koike K., Noguchi Y., Shiraha H., Sakaguchi K., Nakayama E., Yamamoto K. Hepatitis C virus NS4 protein impairs the Th1 polarization of immature dendritic cells // *J. Viral. Hepat.* — 2010. — Vol. 17. — P. 555–562.
 33. Tarrats N., Moles A., Morales A., García-Ruiz C., Fernández-Checa J.C., Marí M. Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis // *Hepatology*. — 2011. — Vol. 54. — P. 319–327.
 34. Tawadrous G.A., Aziz A.A., Amin D.G., Eldemery A., Mostafa M.A. RANTES, TNF α , oxidative stress, and hematological abnormalities in hepatitis C virus infection // *J. Investig. Med.* — 2012. — Vol. 60. — P. 878–882.
 35. Vargas A., Berenguer J., Catalan P., Miralles P., López J.C., Cosín J., Resino S. Association between plasma levels of eotaxin (CCL-11) and treatment response to interferon-alpha and ribavirin in HIV/HCV co-infected patients // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2010. — Vol. 65. — P. 303–306.
 36. Watowich S.S., Liu Y.J. Mechanisms regulating dendritic cell specification and development // *Immunol. Rev.* — 2010. — Vol. 238. — P. 76–92.
 37. Weng H.L., Liu Y., Chen J.L., Huang T., Xu L.J., Godoy P., Hu J.H., Zhou C., Stickel F., Marx A., Bohle R.M., Zimmer V., Lammert F., Mueller S., Gigou M., Samuel D., Mertens P.R., Singer M.V., Seitz H.K., Dooley S. The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor β 1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis // *Hepatology*. — 2009. — Vol. 50. — P. 230–243.
 38. Wu J., Meng Z., Jiang M., Zhang E., Trippler M., Broering R., Bucchi A., Krux F., Dittmer U., Yang D., Roggendorf M., Gerken G., Lu M., Schlaak J.F. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific // *Immunology* — 2010. — Vol. 129. — P. 363–374.
 39. Ying Zh., Ma C.J., Ni L., Zhang C.L., Wu X.Y., Kumaraguru U., Li C.F., Moorman J.P., Yao Z.Q. Cross-talk between programmed death-1 and suppressor of cytokine signaling-1 in inhibition of IL-12 production by monocytes/macrophages in hepatitis C virus infection // *J. Immunol.* — 2011. — Vol. 186. — P. 3093–3103.
 40. Yoshimura T., Yuhki N., Moore S.K., Appella E., Lerman M.I., Leonard E.J. Human monocyte chemoat-

tractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE // FEBS Lett. — 1989. — Vol. 244. — P. 487–493.

41. Zhang L.J., Zheng W.D., Chen Y.X., Huang Y.H., Chen Z.X., Zhang S.J., Shi M.N., Wang X.Z. Anti-fibrotic effects of interleukin-10 on experimental hepatic fibrosis // Hepatogastroenterology. — 2007. — Vol. 54. — P. 2092–2098.