

ЭКСПРЕССИЯ ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В КРОВИ И ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С

Жданов К.В.¹, Гусев Д.А.¹, Чирский В.С.¹, Сысоев К.А.², Якубовская Л.А.³, Шахманов Д.М.¹, Тотолян Арег А.²

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

³ Технологический институт, Санкт-Петербург

Резюме. Хронический гепатит С (ХГС) является широко распространенным заболеванием с длительным инкубационным периодом и стертой клинической картиной. Патогенез ХГС несмотря на интенсивные усилия остается неясным. Ввиду скудности клинических проявлений диагностика и мониторинг ХГС вызывают значительные трудности. В этой связи, так как хемокины являются медиаторами хронического воспаления, представляется актуальным исследовать местный и системный иммунный ответ путем определения мРНК хемокинов и хемокиновых рецепторов как в биоптате печени, так и в периферической крови. В настоящем исследовании были изучены кровь и биоптаты печени 21 пациента с ХГС. В качестве контроля на предмет содержания мРНК хемокинов и рецепторов к ним была изучена периферическая кровь 10 HCV-негативных здоровых добровольцев. Всем пациентам была проведена биопсия печени и последующее гистологическое исследование, включающее в себя изучение выраженности воспаления и фиброза. В зависимости от гистологической картины пациенты были разбиты на группы. Изучались следующие хемокины: MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES и рецепторы: CCR1, CCR2, CCR3, CCR5. В результате исследования было обнаружено, что у пациентов с ХГС наблюдается достоверное повышение содержания мРНК MCP-1 в ткани печени по мере прогрессирования заболевания, кроме того, уровень содержания мРНК MCP-1 в печени достоверно превышал таковой в крови. Содержание мРНК CCR1, CCR2, CCR3 и CCR5 в крови пациентов с минимальными гистологическими проявлениями ХГС были достоверно ниже, чем при более выраженных изменениях. Показатели экспрессии мРНК CCR1 и CCR5 в крови прямо коррелировали с индексом гистологической активности и выраженностью фиброза. Содержание мРНК MCP-1 в биоптате находилось в прямой зависимости от гистологических изменений. Таким образом, проведенное исследование демонстрирует, что прогрессирование ХГС реализуется через местную активацию синтеза мРНК MCP-1, что в дальнейшем приводит к присоединению системной реакции в виде повышения экспрессии CCR1, CCR2, CCR3 и CCR5 в периферической крови.

Ключевые слова: хемокины, хемокиновые рецепторы, мРНК, хронический гепатит С.

Zhdanov K.V., Gushev D.A., Chirskiy V.S., Syssoev K.A., Yakubovskaya L.A., Shakhmanov D.M., Totolian Areg A.
CHEMOKINES AND THEIR RECEPTORS EXPRESSION IN BLOOD AND LIVER TISSUE IN CHRONIC HEPATITIS C

Abstract. Chronic hepatitis C (CHC) is widely spread disease with a long incubation period and weakly expressed clinical features. Pathogenesis of CHC despite of intensive efforts is still unclear. Due to scarcity of clinical signs diagnosis and monitoring of CHC represent considerable difficulties. Chemokines and chemokine receptors are fascinating object for investigation since they are mediators of chronic inflammation. Therefore, studying local and systemic

Адрес для переписки:

Сысоев Кирилл Александрович, к.м.н.,
ст. науч. сотр. НМЦ по молекулярной медицине
на базе СПбГМУ им. И.П. Павлова.
Тел.: (812) 234-90-39.
E-mail: ksyssoev@mail.ru

immune response by evaluating expression of genes encoding chemokines and their receptors is of sufficient interest. In present study we investigated peripheral leukocytes samples and liver biopsies from 21 CHC patients. Blood leukocytes of 10 healthy volunteers were studied as a control for expression of mRNA for chemokines and their receptors. For all biopsies histological examination including evaluation of fibrosis and histological activity index was performed. mRNA's encoding MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, CCR1, CCR2, CCR3, and CCR5 were under study. We found that the level of liver MCP-1 mRNA expression is increased reflecting degree of disease progression, moreover it was significantly higher in liver as compared with blood. The results of study showed that the changes in chemokine/receptor system in blood of CHC patients were significantly stronger as compared with intrahepatic expression of specific mRNA's. The contents of CCR1, CCR2, CCR3, and CCR5 mRNA in patients with minimal histological manifestations were significantly lower than in group with more severe ones. CCR1 and CCR5 mRNA expression did directly correlate with histological activity index and fibrosis degree. The values MCP-1 mRNA's in liver biopsies were in direct correlation with histological manifestations. In general, our study shows that CHC progression may be connected with local activation of MCP-1 gene thus leading to systemic response as increased expression of CCR1, CCR2, CCR3, and CCR5 genes in peripheral blood leukocytes. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 379-388)

Введение

Вирус гепатита С (HCV – hepatitis C virus) является одной из основных причин развития большинства диффузных заболеваний печени, включая хронический гепатит, цирроз печени и первичную гепатокарциному. HCV-инфекция представляет собой одну из наиболее актуальных медико-социальных проблем в мире, что обусловлено широким стабильно высоким уровнем заболеваемости и повсеместным распространением, а также существенными экономическими затратами на диагностический и лечебный процессы. Подавляющее большинство трансплантаций печени проводится по поводу последствий хронического гепатита С (ХГС) [1].

Особое внимание врачей-исследователей акцентировано на изучение вопросов иммунопатогенеза ХГС, что может иметь определенное значение для оценки течения и прогноза заболевания, а также эффективности противовирусной терапии. Одним из новых направлений в современной иммунологии является исследование хемокинов и их рецепторов в биологических субстратах при широком спектре заболеваний.

Хемокины – маленькие (5-20 kDa) катионные белки, связывающие гепарин и имеющие между собой 20-70% гомологии [7, 8]. Хемокины составляют большое семейство маленьких цитокинов преимущественно с четырьмя консервативными цистеинами, связанными между собой дисульфидными связями: первый с третьим, второй с четвертым. Согласно количеству и расположению консервативных цистеинов различают 4 семейства хемокинов. Три из них (СС, СХС и СХХС) содержат по четыре цистеина, а четвертое семейство (С) – только два, соответствующие первому и третьему цистеинам в других группах. Основное количество хемокинов относится к СХС и к СС семействам, в то время как С и СХХС имеют пока только по одному

представителю. Функционально СХС хемокины активны прежде всего в отношении нейтрофилов и Т-лимфоцитов, а СС хемокины – моноцитов, базофилов и эозинофилов [4].

На уровне клетки биологическая активность хемокинов проявляется следующим образом: хемотаксис лейкоцитов, дегрануляция лейкоцитов, активация респираторного взрыва, активация интегринов. В то же время на уровне целостного организма они участвуют в самых различных процессах в физиологических и патологических условиях: циркуляция лимфоцитов, дифференцировка Th1/Th2, ангиогенез и ангиостаз, развитие лимфоидных органов, рекрутирование клеток, воспаление, заживление ран, метастазирование опухоли [2, 3].

По данным Черных и соавт. [6], при хронических вирусных гепатитах в стадии фиброза и цирроза клетки периферической крови активно продуцируют цитокины, ответственные как за Th1-, так и за Th2-тип иммунного ответа, что, по мнению авторов, характеризует вариабельность иммунных нарушений при стимулированном вирусами хроническом воспалительном процессе.

В литературе, посвященной изучению внутрипеченочной экспрессии мРНК хемокинов при ХГС, отмечен их возможный вклад в прогрессирование заболевания. Так, Appolinario и соавт. [9] отмечено, что у пациентов с ХГС в ткани печени экспрессируется мРНК RANTES, что ассоциируется с выраженностью внутрипеченочного воспаления. В работе Камаг и соавт. [10] показано, что IL-8, экспрессируемый внутрипеченочно, коррелирует с длительностью ХГС. В исследовании Nischalke и соавт. [11] установлено, что у пациентов с ХГС в ткани печени наблюдается сниженная по сравнению с контролем экспрессия мРНК MIP-1 β и MCP-1, в то время как уровень экспрессии мРНК RANTES резко повышен. Авторами также отмечена тенденция

повышения экспрессии RANTES с ростом уровня гистологической активности. Однако остается мало изученным вклад хемокинов в патогенез HCV-инфекции в сопоставлении с основными клинико-лабораторными и морфологическими показателями, что, возможно, может иметь определенное значение в прогнозе течения заболевания. В нескольких исследованиях отмечено, что при хронической HCV-инфекции отмечается инфильтрация печени различными типами Т-лимфоцитов. Так, в работе Giuggio и соавт. [12] показано, что при хроническом гепатите С печень пациентов инфильтрируется HCV-реактивными Т-лимфоцитами, фенотип которых сильно варьирует. Freeman и соавт. [13] отмечено, что преобладающей популяцией лимфоцитов во внутрипеченочном пуле являются активированные HCV CD8⁺ клетки. Voisvert и соавт. [14] установлено, что NK-клетки превалируют среди других типов лимфоцитов (Т-, В- и НКТ-лимфоцитов), привлеченных в печень при ХГС. Авторами показана выраженная экспрессия на внутривнутрипеченочных лимфоцитах хемокиновых рецепторов: CCR5, CXCR3 и CXCR6. Все вышеизложенное послужило причиной для проведения настоящего исследования.

Материалы и методы

В клинике инфекционных болезней Военно-медицинской академии под наблюдением находился 21 пациент с ХГС (14 мужчин и 7 женщин). Возраст больных варьировал от 20 до 49 лет и в среднем составил $32,3 \pm 9,8$ лет. В качестве контрольной группы для сравнения показателей экспрессии хемокинов и рецепторов в крови было обследовано 10 здоровых добровольцев сходной возрастной группы.

Все больные поступали в клинику инфекционных болезней для углубленного обследования в связи с обнаружением в крови анти-HCV антител.

Комплексное 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 в ИФА, молекулярно-биологические исследования крови с использованием ПЦР для оценки качественного и количественного содержания РНК ВГС и его генотипирования, УЗИ органов брюшной полости, пункционную биопсию печени с последующим морфологическим исследованием гепатобиоптата, определение экспрессии мРНК хемокинов и их рецепторов в крови и ткани печени.

Диагноз выставлялся на основании определения в периферической крови анти-HCV антител методом ИФА и РНК ВГС методом ПЦР, а также

наличия фиброза при морфологическом исследовании гепатобиоптата. Больные с острым вирусным гепатитом С и пациенты на стадии цирроза, а также лица с алкоголизмом и наркоманией в исследование не включались. Исключались другие заболевания печени (вирусные, аутоиммунные, метаболические, токсические).

Аспирационная пункционная биопсия печени по Менгину проводилась во время стационарного обследования после получения информированного согласия пациента, а также изучения функции системы гемостаза, УЗИ органов брюшной полости и внутрикожной пробы на новокаин или лидокаин. Использовались одноразовые наборы для слепой чрескожной биопсии печени «Herafix» производства компании «B. Braun Melsungen AG».

Пункция выполнялась натошак в положении пациента «лежа на спине с запрокинутой за голову правой рукой» в IX или X межреберье между средней и передней подмышечными линиями. Для комплексного гистологического исследования предоставлялся биоптат печени длиной от 1 до 4 см. После процедуры больным назначался строгий постельный режим и динамическое врачебное наблюдение в течение суток после операции.

Для гистологического исследования материал фиксировали не менее 2 часов в 10% нейтральном растворе формалина. Обезживание проводили в спиртах восходящей концентрации, фрагменты ткани заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, азуром II и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, хромотропом 2Б водным голубым. Исследование препаратов осуществлялось с использованием светооптического микроскопа БИММ Р-11.

Качественно определяли следующие признаки: наличие портальной инфильтрации, перипортальных некрозов, внутривнутрипеченочных лимфоидных инфильтратов, лимфоидных фолликулов, ацидофильных телец Каунсильмена, полиморфизма ядер гепатоцитов, липофусциноза гепатоцитов, признаков поражения и пролиферации эпителия желчных проточков, наличие гидропической и жировой дистрофии гепатоцитов.

Полуколичественно оценивались активность и стадия патологического процесса в печени (табл. 1). Для этого использовался индекс гистологической активности (ИГА), предложенный R.G. Knodell (1981) и в дальнейшем модифицированный (без четвертой составляющей, характеризующей выраженность фиброза), а для диагностики стадии патологического процесса применялся индекс фиброза в соответствии со стандартизированной системой «METAVIR».

ТАБЛИЦА 1. СОСТАВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ИНДЕКСА ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПО R.G. KNODELL И СТАДИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПО СТАНДАРТИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЕ «METAVIR»

	Компоненты	Баллы
Перипортальные некрозы (с мостовидными или без них)		
А	Отсутствуют	0
Б	Слабо выраженные ступенчатые некрозы	1
В	Умеренно выраженные ступенчатые некрозы, захватывающие менее чем 50% периметра большинства портальных трактов	3
Г	Выраженные ступенчатые некрозы, захватывающие более чем 50% периметра большинства портальных трактов	4
Д	Умеренно выраженные ступенчатые некрозы плюс мостовидные некрозы	5
Е	Выраженные ступенчатые некрозы плюс мостовидные некрозы	6
Ж	Мультилобулярные некрозы	10
Внутридольковые фокальные некрозы и дистрофия гепатоцитов		
А	Отсутствуют	0
Б	Слабо выраженные (ацидофильные тельца, баллонная дегенерация и/или рассыпанные фокусы гепатоцеллюлярных некрозов в менее 1/3 долек или узлов)	1
В	Умеренно выраженные, захватывающие 1/3-2/3 долек или узлов	3
Г	Выраженные, захватывающие более 2/3 долек или узлов	4
Портальное воспаление		
А	Нет портального воспаления	0
Б	Слабо выраженное (единичные воспалительные клетки в менее 1/3 портальных трактов)	1
В	Умеренно выраженное (повышенное количество воспалительных клеток в 1/3-2/3 портальных трактов)	3
Г	Выраженное (плотно заполненные воспалительными клетками более 2/3 портальных трактов)	4
Фиброз		
F0	Нет фиброза	0
F1	Портальный фиброз (слабый)	1
F2	Порто-портальные септы (умеренный)	2
F3	Порто-центральные септы (тяжелый)	3
F4	Цирроз	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).

Всем пациентам проводилось определение экспрессии мРНК некоторых хемокинов (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES) и соответствующих рецепторов (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5) в крови и печени.

Материал биоптата (~0,005 г) сразу после выполнения биопсии вносили в пластиковую пробирку типа «Эппендорф» вместе с 300 мкл лизирующего раствора. Затем помещали пробирку в ультразвуковую мойку FinnSonic (65°C) на 30 мин. По окончании лизиса удаляли оставшуюся ткань. Добавляли 400 мкл изопропанола и пе-

ремешивали пробу на вортексе в течение 3-5 с. Центрифугировали пробирку при 14 000 об/мин в течение 5 мин. Удаляли надосадочную жидкость. Добавляли к осадку 500 мкл 70% раствора этанола и 3-5 раз аккуратно переворачивали пробирку. Центрифугировали пробирку при 14 000 об/мин в течение 5 мин. Удаляли надосадочную жидкость. Добавляли к осадку 500 мкл ацетона и 3-5 раз аккуратно переворачивали пробирку и центрифугировали ее при 14 000 об/мин в течение 5 мин. Удаляли надосадочную жидкость. Открывали крышку пробирки и высушивали осадок при 65°C в течение 5 мин. Добавляли к осадку 50 мкл ДЭПК-Н₂O и прогревали пробу при 65°C в течение 10 мин.

Кровь с добавлением ЭДТА, взятую из кубитальной вены, в количестве 100 мкл вносили в пробирку типа «Эппендорф». Добавляли 1400 мкл ТЕ-буфера, перемешивали на вортексе и оставляли для инкубации при комнатной

температуре на 3 мин. Далее центрифугировали в течение 1 мин при 14 000 об/мин, после чего сливали надосадок. Процедуру отмывки ТЕ-буфером повторяли еще дважды. Далее к осадку добавляли 300 мкл лизирующего раствора и инкубировали пробирку при 65°C в течение 15 мин. Далее добавляли изопропанол и последующее выделение проводили как описано выше.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора «Реверта» (Амплисенс, Москва) согласно инструкции производителя.

Следующим этапом являлась постановка ПЦР со специфическими праймерами (табл. 2). Режим ПЦР: 95°C – 4 мин, 30 х (95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с), 72°C – 7 мин.

В качестве референс-гена использовался бета-актин. Визуализация полученных ПЦР-продуктов осуществлялась в агарозном геле при УФ освещении. Полуколичественная оценка проводилась с помощью программы Gel-Pro, принимая за 100% интенсивность флюоресценции бета-актина.

Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (использовались непараметрический критерий Манна-Уитни, корреляционный анализ Спирмена при уровне значимости $p < 0,05$).

Результаты

По результатам морфологического исследования гепатобиоптатов все пациенты были распределены на следующие группы. По активности патологического процесса в печени: минимальная (А1)

у 8 человек и слабовыраженная (А2) у 13 обследуемых. По стадии процесса: слабый фиброз (F1) – 5 человек, умеренный фиброз (F2) – 11 больных, тяжелый фиброз (F3) – 5 обследуемых.

Значения показателей экспрессии мРНК хемокинов и их рецепторов в крови и печени на различных стадиях хронического гепатита С представлены в табл. 3.

У пациентов с ХГС уровни содержания CCR1, CCR2, CCR3 и CCR5 были достоверно снижены по сравнению со здоровыми донорами ($p = 1,5 \times 10^{-8}$, $1,5 \times 10^{-8}$, $6,1 \times 10^{-8}$, $1,8 \times 10^{-7}$ соответственно – рис. 1). Вместе с тем обращало на себя внимание статистически достоверное нарастание к поздним стадиям заболевания экспрессии мРНК хемокина MCP-1 в крови и ткани печени, а также рецепторов CCR1, CCR3 и CCR5 в крови. Уровень мРНК MCP-1 в ткани печени имеет достоверную тенденцию к нарастанию в зависимости от степени фиброза (табл. 3, рис. 2). Уровень экспрессии гена MCP-1 в печени у пациентов с ХГС достоверно превышал таковой в периферической крови ($p = 0,032$). Экспрессия CCR1, CCR3, CCR5 в крови также повышалась с выраженностью фиброза, однако достоверными различия были только между стадиями F1 и F2.

При анализе экспрессии мРНК у пациентов с различной активностью патологического процесса в печени (табл. 4) выявлены статистически значимые отличия уровней всех изученных в крови рецепторов к хемокинам. У пациентов с минимальной активностью уровень содержания мРНК CCR1, CCR2, CCR3 и CCR5 в крови был достоверно ниже, чем при слабовыраженной активности.

ТАБЛИЦА 2. ДАННЫЕ ОБ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ПРАЙМЕРАХ

Название	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина ампликона, п.н.	T _m , °C
β-актин	ССААГГССААСС GGAGAAGATGAC	AGGGTACATGGTG GTGCCGCCAGAC	587	60
MIP-1 α /CCL3	GCCCCGGTGTCATC TTCCTAACCAAGC	AGGGGACAGGGGA ACTCTCAGAGCAA	353	60
MIP-1 β /CCL4	TGCTGCTTTTCTTA CACCGCGAGGAA	AGAAGGGACAGGA ACTGCGGAGAGGA	291	60
MCP-1/CCL2	САААСТГААГСТС GCACTCTCGCCTC	AGCACAGATCTCC TTGGCCACAATGG	258	60
RANTES/CCL5	CCCCGTGCCACA TCAAGGAGTATTT	CGTCCAGCCTGGG GAAGGTTTTTGTA	316	60
CCR1	СААСТССГТГССА GAAGGTGAA	GCCAGGGCCC AAATGATGAT	421	60
CCR2	ССААСГАГАГССГГ TGAAGAAGTC	TCCGCCAAAATA ACCGATGTGAT	352	60
CCR3	GAGCCCCGACTGT CACTTTTG	CAGATGCTTGC TCCGCTCACAG	410	60
CCR5	СТГГССАТСТСТГА CCTGTTTTTC	CAGCCCTGTGCC TCTTCTTCTCAT	487	60

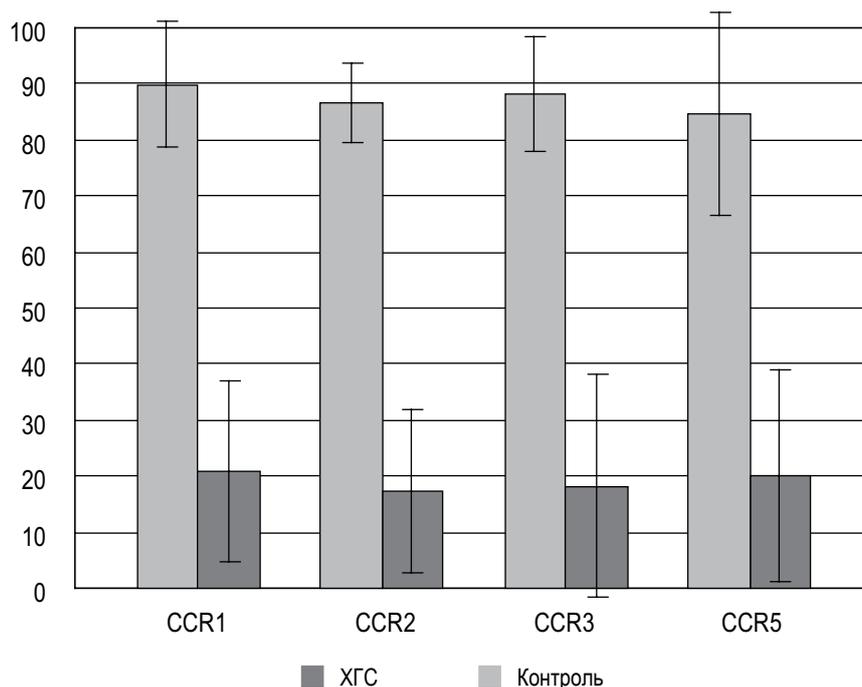


Рисунок 1. Содержание мРНК хемокиновых рецепторов в крови у пациентов с ХГС по сравнению контролем (p < 0,001)

Выявленные ассоциации позволили предположить, что значение хемокинов и их рецепторов в патоморфогенез ХГС в большей степени связано с выраженностью экспрессии мРНК в клетках крови, чем в ткани печени, что, вероятно, косвенно отражает превалирование системного иммунного ответа над местным в патогенезе хронической HCV-инфекции.

Нами была предпринята попытка проанализировать взаимосвязи основных морфологических показателей с экспрессией мРНК хемокинов и их рецепторов (табл. 5).

Выявлено, что фиброз и ИГА коррелировали в большей степени с выраженностью экспрессии мРНК рецепторов хемокинов в клетках крови (рис. 3, 4), что косвенно свидетельствовало о параллельной аутокринной стимуляции лимфоци-

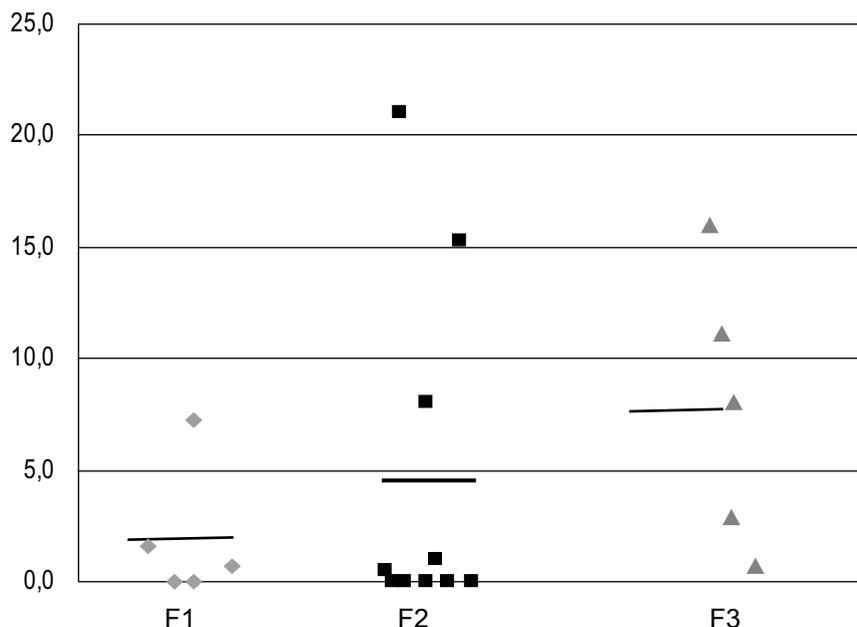


Рисунок 2. Содержание мРНК MCP-1 в ткани печени в зависимости от степени фиброза

Примечание: линией отмечена медиана.

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ мРНК ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В КРОВИ И ПЕЧЕНИ ПРИ ХГС НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ, у.е. (МЕТОД МАННА-УИТНИ, $M \pm \sigma$)

Показатели	F1	F2	F3	pF1-F2	pF1-F3	pF2-F3
Кровь						
RANTES	6,0±7,7	8,7±13,3	16,9±28,7	0,935	0,290	0,626
MCP-1	0,3±0,5	0,6±1,7	1,7±2,8	0,515	0,290	0,061
MIP-1 α	0,7±0,6	1,9±2,2	3,4±4,4	0,329	0,174	0,684
MIP-1 β	1,0±1,2	1,3±1,5	7,0±11,6	0,329	0,096	0,290
CCR1	7,1±6,8	22,6±17,0	28,9±17,7	0,009	0,010	0,290
CCR2	10,7±9,9	18,6±18,3	21,5±11,9	0,193	0,096	0,371
CCR3	6,1±8,0	22,0±24,2	23,5±15,6	0,028	0,010	0,569
CCR5	5,0±5,3	24,2±23,0	27,8±14,1	0,003	0,001	0,464
Гепатобиоптат						
RANTES	5,5±7,2	5,1±8,9	3,7±4,2	0,807	0,762	0,935
MCP-1	1,6±3,0	4,5±7,3	7,7±6,1	0,371	0,002	0,035
MIP-1 α	1,6±1,8	3,1±4,4	1,8±2,2	0,569	0,880	0,684
MIP-1 β	5,5±6,2	5,2±7,9	11,2±11,3	0,515	0,226	0,143
CCR1	23,1±9,3	24,8±16,2	19,8±15,8	0,935	0,290	0,371
CCR2	27,6±14,6	23,6±13,7	20,7±18,8	0,464	0,290	0,371
CCR3	17,6±16,5	20,7±16,1	16,9±15,5	0,626	0,650	0,464
CCR5	12,9±10,1	22,4±17,3	11,9±10,3	0,143	1,000	0,143

тов и моноцитов крови и нарастании активности патологического процесса в печени по мере прогрессии заболевания и указывало на возможную взаимосвязь выявленных ассоциаций.

Также необходимо отметить, что выявленные корреляции выраженности экспрессии MCP-1 в ткани печени с ИГА и стадией заболевания (рис. 5), косвенно отражали нарастание вклада тканевых макрофагов (клеток Купфера) в патоморфогенез ХГС.

Анализ ассоциаций выраженности экспрессии мРНК хемокинов и их рецепторов с основным морфологическим признаком апоптоза гепатоцитов – тельцами Каунсильмена показал, что для пациентов, имеющих этот показатель, характерны более высокие значения мРНК CCR1, CCR3 и CCR5, то есть рецепторов к RANTES, который является хемокином аутокринной стимуляции Т-лимфоцитов. Данные различия подтверждают тот факт, что через Т-клетки, преимущественно цитотоксические лимфоциты, и осуществляются основные механизмы активации апоптоза гепатоцитов при ХГС.

Обсуждение

Таким образом, установленные взаимосвязи между экспрессией мРНК хемокинов и их рецепторов с основными морфологическими про-

ТАБЛИЦА 4. ЭКСПРЕССИЯ мРНК ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В КРОВИ И ПЕЧЕНИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АКТИВНОСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРИ ХГС, у.е. (МЕТОД МАННА-УИТНИ, $M \pm \sigma$)

	A1	A2	p
Кровь			
RANTES	9,1±12,6	10,4±19,2	0,626
MCP-1	0,2±0,4	1,1±2,2	0,188
MIP-1 α	0,9±0,7	2,6±3,2	0,262
MIP-1 β	1,4±1,3	3,4±7,4	0,661
CCR1	7,5±5,2	27,8±16,4	< 0,001
CCR2	6,4±3,4	23,8±15,6	< 0,001
CCR3	3,8±4,2	25,7±21,7	< 0,001
CCR5	5,4±3,6	29,4±19,6	< 0,001
Гепатобиоптат			
RANTES	5,6±6,0	4,8±8,1	0,188
MCP-1	3,9±5,5	4,9±6,9	0,380
MIP-1 α	2,0±2,1	2,8±4,1	0,961
MIP-1 β	7,0±6,2	6,6±9,6	0,242
CCR1	27,0±11,9	21,1±15,2	0,051
CCR2	27,9±14,4	21,2±14,7	0,088
CCR3	19,9±16,4	18,4±15,1	0,770
CCR5	18,9±14,8	17,1±14,7	0,661

**ТАБЛИЦА 5. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ
ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВ
И ИХ РЕЦЕПТОРОВ СО СТЕПЕНЬЮ АКТИВНОСТИ
ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА И СТАДИЕЙ ФИБРОЗА
У ПАЦИЕНТОВ С ХГС (МЕТОД СПИРМЕНА)**

	ФИБРОЗ		ИГА	
	R	p	R	P
Кровь				
RANTES	0,18	0,248	0,01	0,949
MCP-1	0,21	0,176	0,06	0,715
MIP-1 α	0,23	0,136	0,13	0,415
MIP-1 β	0,36	0,015	0,12	0,450
CCR1	0,45	0,002	0,62	0,8 x 10⁻⁵
CCR2	0,29	0,054	0,56	0,4 x 10⁻⁵
CCR3	0,22	0,148	0,42	0,005
CCR5	0,52	0,2 x 10⁻³	0,63	0,4 x 10⁻⁵
Гепатобиоптат				
RANTES	0,06	0,680	-0,01	0,957
MCP-1	0,45	0,002	0,37	0,013
MIP-1 α	0,12	0,434	0,06	0,694
MIP-1 β	0,17	0,265	0,13	0,388
CCR1	-0,09	0,546	-0,10	0,534
CCR2	-0,21	0,168	-0,13	0,395
CCR3	-0,03	0,859	0,05	0,771
CCR5	0,04	0,779	0,07	0,674

явлениями ХГС позволили раскрыть некоторые иммунопатогенетические механизмы течения HCV-инфекции. В частности, полученные данные косвенно свидетельствовали о доминировании системного иммунного ответа над местным, о сильной взаимосвязи экспрессии мРНК рецепторов хемокинов с активностью патологического процесса и стадией заболевания, о нарастании вклада клеток Купфера в выраженность воспаления в печени к поздним стадиям, что позволяет

раскрыть некоторые аспекты иммунопатогенеза ХГС. Результаты наших исследований свидетельствуют, что содержание мРНК MCP-1 в ткани печени является показателем, отражающим как выраженность фиброза, так и активность воспалительного процесса. Вероятно, что одним из первых событий в развитии ХГС является повышение активности MCP-1 (местный ответ), после чего развивается системная реакция в виде повышении экспрессии мРНК CCR1, CCR2, CCR3 и CCR5 клетками периферической крови. Активность синтеза мРНК перечисленных рецепторов к хемокинам растет по мере прогрессирования воспалительного процесса (табл. 4). Вместе с тем обращает на себя внимание резко сниженный уровень экспрессии мРНК у пациентов с ХГС по сравнению с контролем (рис. 4), что возможно, отражает, неблагоприятный преморбидный фон, предшествующий развитию ХГС. В наших предыдущих исследованиях было обнаружено, что в плазме крови пациентов с ХГС у пациентов с 1 β -генотипом HCV наблюдается повышенное содержание мРНК RANTES и MIP-1 β по сравнению с нормой и другими генотипами вируса [5].

При хронической HCV-инфекции прямое цитопатическое действие вируса на ткань печени выражено незначительно. Кровоснабжение печени имеет ряд физиологических особенностей: наличие депо крови, кровотока, осуществляемый как через портальную вену, так и через печеночную артерию, образующий синусоидальную сосудистую структуру. Эндотелиальные клетки печени (ЭКП) отличаются наличием пор в межклеточных промежутках и отсутствием базальной мембраны, что способствует трансэндотелиальной миграции лимфоцитов и контакту растворимых и поверхностных антигенов с клетками печеночной паренхимы. В нашем исследовании содержание мРНК хемокиновых рецепторов CCR1, CCR2, CCR3 и CCR5 в клетках периферической крови было достоверно выше в группе с большим индексом гистологической активности. Вероятно, что повышенная экспрессия

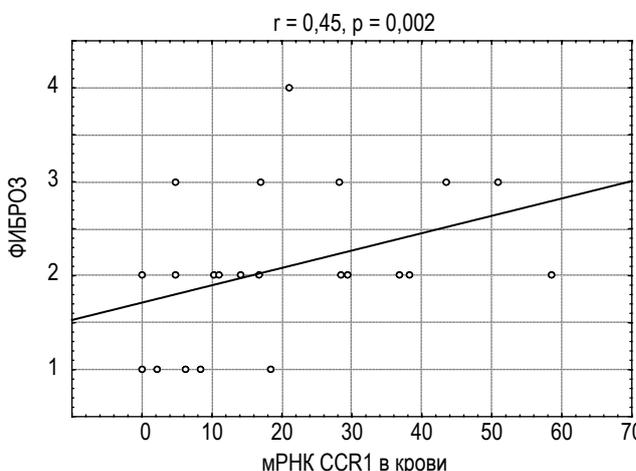
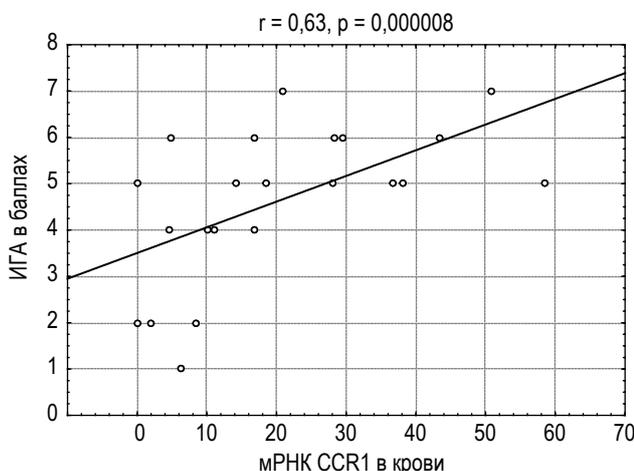


Рисунок 3. Корреляционные взаимосвязи между экспрессией мРНК CCR1 и местными проявлениями ХГС (фиброз и ИГА)

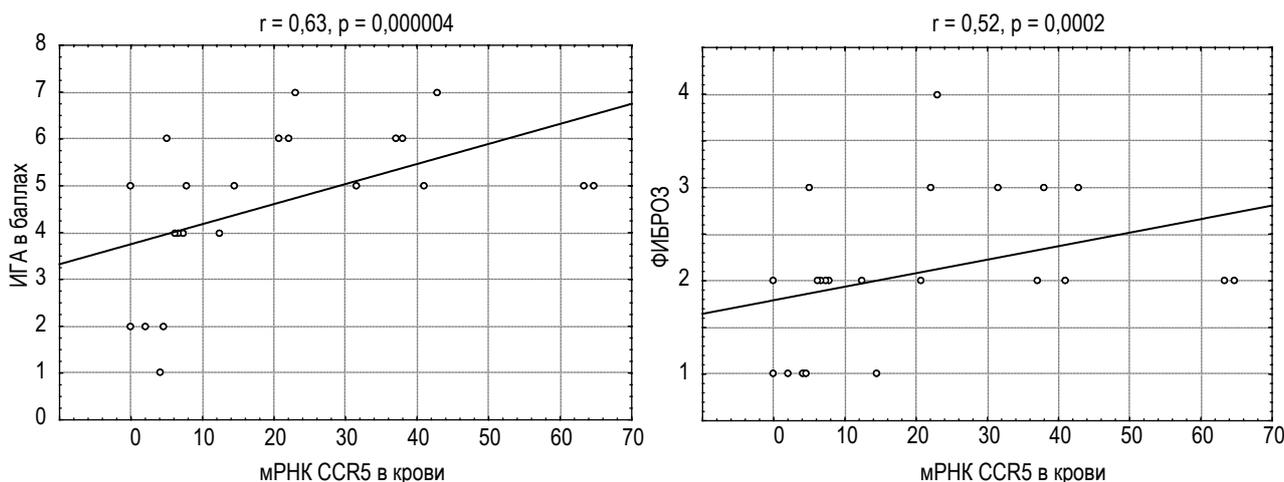


Рисунок 4. Корреляционные взаимосвязи между экспрессией CCR5 и местными проявлениями ХГС (фиброз и ИГА)

мРНК хемокиновых рецепторов клетками периферической крови способствует в процессе кровоснабжения печени повреждению печеночной паренхимы цитотоксическими Т-лимфоцитами как прямым цитолитическим действием, так и опосредованно через систему Fas/FasL. По данным Warren и соавт. [15], наивные CD8⁺ лимфоциты, проходя через эндотелий печени, приобретают активированный статус. Исследование, проведенное Edwards и соавт. [16], демонстрирует, что совместное культивирование гепатоцитов и эндотелиальных клеток печени повышает экспрессию гепатоцитами молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина. Таким образом, эндотелий печени обладает свойствами активировать и клетки печени, и лимфоциты, что в процессе хронического воспаления служит фактором, поддерживающим патологический процесс. В исследовании Кагга и соавт. [17] изучалась роль ЭКП в регуляции апоптоза активированных Т-лимфоцитов. Исследование показало, что смешанное культивирование Т-лимфоцитов и ЭКП приводило к апоптозу только активированные Т-лимфоциты, не затрагивая наивные

Т-клетки, что опосредовалось индукцией каспаз 3 и 8, а также проапоптогенного белка Вак. Подобные эффекты вместе с данными, процитированными выше, демонстрируют многогранную роль ЭКП при взаимодействии с иммунной системой, которая проявляется как в поддержании толерантности в норме, так и при патологических условиях в активации Т-лимфоцитов. По данным Nattermann и соавт. [18], в биоптатах печени пациентов с ХГС отмечено повышенное по сравнению со здоровым контролем содержание CCR5-позитивных дендритных клеток. Авторами на основании дополнительных исследований *in vitro* делается вывод о HCV-индуцированной внутрипеченочной продукции RANTES, что способствует, по их мнению, привлечению и созреванию дендритных клеток при ХГС через соответствующий рецептор (CCR5). Вовлеченность системы хемокинов в патологический процесс при ХГС иллюстрирует исследование Hellier и соавт. [19]. Авторами изучались роль генных полиморфизмов RANTES и CCR5 в портальном воспалении при ХГС. Показано, что генные варианты δ32 (CCR5) и -403 (RANTES) ассоци-

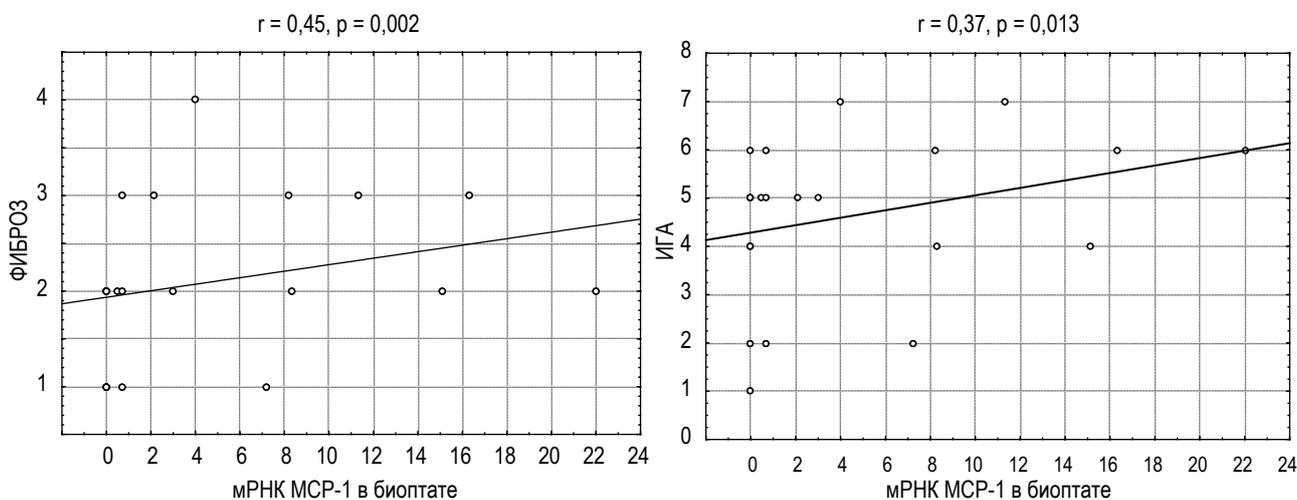


Рисунок 5. Взаимосвязь между экспрессией MCP-1 в биоптате и местными проявлениями ХГС (ИГА и фиброз)

ированы с меньшей выраженностью портального воспаления при ХГС.

В качестве заключения можно сказать, что исходя из полученных нами данных, степень повреждения печеночной паренхимы при ХГС обусловлена внутрипеченочной экспрессией мРНК MCP-1, а также выраженностью синтеза мРНК хемокиновых рецепторов CCR1, CCR2, CCR3 и CCR5 иммунокомпетентными клетками периферической крови.

Список литературы

1. Лобзин Ю.В., Жданов К.В., Волжанин В.М., Гусев Д.А. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение. — СПб.: — Фолиант, 2003. — 192 с.
2. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы: Т. 1 Нейтрофилы; Т. 2 Моноциты/Макрофаги — СПб.: Наука, 2000. — 231 с.
3. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы: Т. 3 Лимфоциты; Т. 4 Базофилы и тучные клетки; Т. 5 Эозинофилы — СПб.: Наука, 2001. — 390 с.
4. Тотолян А.А. Роль хемокинов и их рецепторов в иммунорегуляции // Иммунология. — 2001. — № 5. — С. 7-15.
5. Сысоев К.А., Морозова Е.Б., Чухловин А.Б., Дунаева Н.В., Эсауленко Е.В., Антонова Т.В., Беляева Т.В., Тотолян Арег А. Экспрессия мРНК хемокинов у пациентов с различными генотипами вируса гепатита С // Мед. иммунология. — 2004. — Т. 6. — № 3-5. — С. 339.
6. Черных Е.Р., Старостина Н.М., Леплина О.Ю., Шевела Е.А., Агапитова С.В., Шипунов М.В., Останин А.А., Козлов В.А. Цитокиновый профиль у больных хроническими вирусными гепатитами с фиброзом и циррозом печени // Медицинская иммунология. — 2006. — Т. 8. — № 6. — С. 539-546.
7. Baggiolini M., Dewald B., Moser B. Human chemokines: an update // Annu. Rev. Immunol. — 1997. — Vol. 15. — P. 675-705.
8. Baggiolini M., Dewald B., Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines — CXC and CC chemokines // Adv. Immunol. — 1994. — Vol. 55. — P. 97-179.
9. Apolinario A., Majano P., Alvarez-Pérez E., Saez A., Lozano C., Vargas J., García-Monzón C. Increased expression of T-cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease // Am. J. Gastroenterol. — 2002. — Vol. 97. — P. 2861-2870.
10. Kamar N., Rostaing L., Sandres-Saune K., Selves J., Barthe C., Dubois M., Alric L., Durand D., Izopet J. Intrahepatic Cytokine Profile in Renal Transplant Patients Infected by Hepatitis C Virus // J. Med. Virol. — 2005. — Vol. 76. — P. 482-488.
11. Nischalke H., Nattermann J., Fischer H., Sauerbruch T., Spengler U., Dumoulin F. Semiquantitative analysis of intrahepatic CC-chemokine mRNAs in chronic hepatitis C // Mediators of Inflammation — 2004. — Vol. 13. — P. 357-359.
12. Giuggio V.M., Bonkovsky H.L., Rothman A.L. Evolution of the intrahepatic T cell repertoire during chronic hepatitis C virus infection. // Viral Immunol. — 2005. — Vol. 18. — P. 179-189.
13. Freeman A.J., Pan Y., Harvey C.E., Post J.J., Law M.G., White P.A., Rawlinson W.D., Lloyd A.R., Marinos G., French R.A. The presence of an intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response is associated with low viral load in patients with chronic hepatitis C virus infection // J. Hepatol. — 2003. — Vol. 38. — P. 349-356.
14. Boisvert J., Kunkel E.J., Campbell J.J., Keefe E.B., Butcher E.C., Greenberg H.B. Liver-infiltrating lymphocytes in end-stage hepatitis C virus: subsets, activation status, and chemokine receptor phenotypes // J. Hepatol. — 2003. — Vol. 38. — P. 67-75.
15. Warren A., Le Couteur D.G., Fraser R., Bowen D.G., McCaughan G.W., Bertolino P. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells // Hepatology. — 2006. — Vol. 44. — P. 1083-1085.
16. Edwards S., Lalor P.F., Nash G.B., Rainger G.E., Adams D.H. Lymphocyte traffic through sinusoidal endothelial cells is regulated by hepatocytes // Hepatology. — 2005. — Vol. 41. — P. 451-459.
17. Karrar A., Broome U., Uzunel M., Qureshi A.R., Sumitran-Holgersson S. Human liver sinusoidal endothelial cells induce apoptosis in activated T cells: a role in tolerance induction // Gut. — 2007. — Vol. 56. — P. 243-252.
18. Nattermann J., Nischalke H.D., Feldmann G., Ahlenstiel G., Sauerbruch T., Spengler U. Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5 // J. Viral. Hepat. — 2004. — Vol. 11. — P. 519-526.
19. Hellier S., Frodsham A.J., Hennig B.J., Klenerman P., Knapp S., Ramaley P., Satsangi J., Wright M., Zhang L., Thomas H.C., Thursz M., Hill A.V. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection // Hepatology. — 2003. — Vol. 38. — P. 1468-1476.

поступила в редакцию 14.03.2007
принята к печати 22.05.2007