

# ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ С ФИБРОЗОМ И ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

Черных Е.Р., Старостина Н.М., Леплина О.Ю.,  
Шевела Е.Я., Агапитова С.В., Шипунов М.В.,  
Останин А.А., Козлов В.А.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

**Резюме.** В работе проведен сравнительный анализ спонтанной и LPS-стимулированной продукции цитокинов, характеризующих баланс Th1/Th2 (IFN- $\gamma$ /IL-4, IL-13), а также про- и противовоспалительную активность моноцитов (TNF- $\alpha$ /IL-10) в культурах клеток крови здоровых доноров и больных хроническими вирусными гепатитами с наличием фиброза и цирроза печени. Показано, что клетки периферической крови обследованных больных характеризуются выраженным усилением цитокин-продуцирующей функции, что проявляется высоким уровнем спонтанной и индуцированной продукции как Th1/провоспалительных, так и Th2/противовоспалительных цитокинов. При этом трансформация в цирроз связана с усилением спонтанной продукции IL-4 и IL-13 и прогрессирующим возрастанием спонтанной продукции IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-10. В свою очередь утяжеление цирроза ассоциируется с нарастанием выраженности воспалительной активности крови и снижении противовоспалительного потенциала. Так, больные с циррозом печени класса С характеризуются значительно более высокими индексами соотношения TNF- $\alpha$ /IL-10 и IFN- $\gamma$ /IL-10, чем больные с циррозом класса А. Кроме того была выявлена прямая взаимосвязь индекса TNF- $\alpha$ /IL-10 с интенсивностью цитолиза и тяжестью цирроза (баллом по Child-Pugh) и обратная связь между тяжестью цирроза и индексом LPS-стимуляции IL-10. Доминирование провоспалительных цитокинов, проявляющееся в увеличении индекса соотношения IFN- $\gamma$ /IL-10 ассоциировано также с наличием анемии. Таким образом, особенности продукции цитокинов клетками крови при хронической вирусной инфекции у больных с фиброзом и циррозом печени отражают характер клинического течения заболевания.

*Ключевые слова:* Th1/Th2, про-/противовоспалительные цитокины, цирроз печени.

*Chernykh E.R., Starostina N.M., Lepkina O.Yu., Shevela E.Ya., Agapitova S.V., Shipunov M.V., Ostanin A.A., Kozlov V.A.*

## CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRUS HEPATITIS COMPLICATED WITH FIBROSIS AND CIRRHOSIS

**Abstract.** In present study, a comparative analysis of spontaneous and LPS-stimulated production of Th1/Th2 (IFN- $\gamma$ /IL-4, IL-13), and monocyte-derived pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ /IL-10) was carried out in blood cell cultures of healthy donors and the patients with chronic viral hepatitis complicated with liver fibrosis and cirrhosis. The patients' cells exhibited an increased production of both Th1/proinflammatory and Th2/anti-inflammatory cytokines. Meanwhile, hepatitis-induced cirrhotic transformation correlates with enhancement of spontaneous IL-4 and IL-13 production (not observed in fibrosis patients), and progressive increase of spontaneous IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 secretion. In turn, the progression of cirrhosis is connected with increase of pro-inflammatory blood activity and reduction of anti-inflammatory potential. E.g., the pa-

### Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна  
630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д.14,  
ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН,  
Тел.: 383-236-03-29, факс 383-222-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru

tients with grade C cirrhosis have significantly higher index of TNF- $\alpha$ /IL-10 and IFN- $\gamma$ /IL-10 ratio, as compared to the grade A patients. Moreover, we revealed a positive correlation of TNF- $\alpha$ /IL-10 ratio with cytolysis and severity of cirrhosis (Child-Pugh score), and a reverse correlation between the grade of liver cirrhosis and LPS-induced stimulation index of IL-10. Predominance of pro-inflammatory cytokines, displayed as increased IFN- $\gamma$ /IL-10 ratio, was also associated with presence of anemia. Hence, the profile of cytokines produced by peripheral blood cells reflects some clinical features in the patients with chronic virus hepatitis complicated with fibrosis and cirrhosis. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 4, pp 539-546)

## Введение

Исследования последних лет со всей очевидностью показали, что иммунокомпетентные клетки и продуцируемые ими цитокины играют исключительно важную роль в прогрессирующем повреждении печени и развитии фиброза при различных формах гепатита, особенно вирусной этиологии. Противовирусный иммунный ответ сопряжен с активацией CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и реализуется с участием хелперных клеток первого (Th1) и второго (Th2) типа. Th1 индуцируют генерацию противовирусных цитотоксических CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, а Th2-клетки стимулируют продукцию специфических антител [21]. Соотношение Th1/Th2 цитокинов в свою очередь определяет особенности активации макрофагов. При стимуляции IFN- $\gamma$  (классический путь активации) макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины, поддерживающие Th1-ответ, тогда как при стимуляции IL-4 (альтернативная активация) - противовоспалительные цитокины и, соответственно обладают супрессорной активностью в отношении клеточных реакций [16, 12].

Баланс различных функциональных типов Т-клеток и макрофагов во многом определяет эффективность противовирусного ответа. При этом ведущая роль отводится Th1, которые через продукцию IFN- $\gamma$  активируют цитотоксическую активность CD8 Т-клеток и макрофагов и усиливают экспрессию HLA антигенов I класса [23, 19]. Однако поскольку при хронических формах инфекции полной элиминации вирусов не происходит, Th1 ответ играет, по-видимому, двойственную роль – с одной стороны, способствует подавлению репликации вируса, а с другой – опосредует иммунные механизмы повреждения печени [4, 22, 17]. При этом имеются основания полагать, что механизмы, ответственные за элиминацию вируса и цитолиз гепатоцитов, могут быть различны. Так, например, продуцируемые цитотоксическими Т-клетками и макрофагами цитокины (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) способны ингибировать репликацию вирусов в инфицированных клетках нецитолитическим путем, то есть без разрушения гепатоцитов [9]. Доминирование Th2 ответа при хронических формах вирусных гепатитов ассоциировано со снижением противовирусного ответа и как результат – прогрессией инфекции и развитием фиброза с последующей трансформацией в цирроз печени [23, 5, 1].

Развитие фиброза представляет ответную реакцию организма на повреждение печени и связано с замещением поврежденных клеток соединительной тканью. Одним из ключевых профиброгенных факторов, стимулирующих синтез белков внеклеточного матрикса, является TGF- $\beta$ . Кроме того, профиброгенной активностью обладают IL-13 и IL-4. Развитию фиброза во многом способствуют хемокины MCP-1 и RANTES, тогда как IFN- $\gamma$  и IL-10 обладают антифиброгенной активностью [13, 3, 14]. Таким образом, репертуар цитокинов может определять не только выраженность противовирусного и воспалительного ответа, но и особенности фиброгенеза.

Следует подчеркнуть, что особенности продукции цитокинов и их роль в процессах воспаления и фиброза при хронических вирусных гепатитах (ХВГ) остаются во многом неизученными. Имеющиеся в литературе данные зачастую носят противоречивый характер. Особенно это касается больных циррозом печени, у которых процессы воспаления и фиброза протекают одновременно. Исследование продукции цитокинов у данной категории больных интересно еще и тем, что запуск цитокинового каскада связан не только с вирусной инфекцией, но и с эндотоксемией, которая развивается на фоне портальной гипертензии вследствие транслокации бактериальной флоры из кишечника в кровотоки [6].

Исходя из этого, целью настоящей работы явилось изучение особенностей продукции Th1/Th2 (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13) и про-/противовоспалительных (TNF- $\alpha$ , IL-10) цитокинов при ХВГ на фоне формирования фиброза и цирроза печени.

## Материалы и методы

В исследование были включены 23 больных (15 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 18 до 55 лет (средний возраст  $36 \pm 2,5$ ). На основании клинического, лабораторно-инструментального и гистологического исследования у всех пациентов диагностировался хронический вирусный гепатит с наличием фиброза 2-3 стадии (n=7) и цирроза (n=16) печени. В соответствии с классификацией цирроза печени по Child-Pugh класс А диагностировался у 5, класс В у 6 и класс С у 5 пациентов. Причиной ХВГ у 12 пациентов явилась HCV, у 8 пациентов HBV и у трех пациентов смешанная HCV- и HBV-инфекция. Контрольную группу составили 20 здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и воз-

расту. Обследование всех пациентов проводилось при получении информированного согласия.

Продукцию цитокинов изучали в культурах клеток цельной крови. Для этого гепаринизированную (20 ЕД/мл) венозную кровь разводили в 5 раз средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера и 100 мкг/мл гентамицина, и культивировали в течение 24 ч в круглодонных, стерильных пробирках в присутствии липополисахарида (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл, а также в отсутствие митогенной стимуляции (спонтанная продукция). Культивирование проводили при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего собирали супернатанты и хранили полученные образцы при -20°C до тестирования. Параллельно в день гемоэкспузии на гемоанализаторе «HEMA-Screen 13» (Швейцария-Италия) проводили общий анализ крови с целью определения абсолютного количества мононуклеарных клеток (лимфоцитов и моноцитов), количества эритроцитов и уровня гемоглобина.

Концентрацию цитокинов в супернатантах цельной крови оценивали методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Полученные значения пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества мононуклеарных клеток (МНК) и выражали в пг/мл/10<sup>6</sup> МНК. Индекс стимуляции липополисахарида (ИС<sub>LPS</sub>) рассчитывали как отношение концентрации цитокинов в LPS-стимулированных культурах к уровню их спонтанной продукции.

Математическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с использованием пакета программ «STATISTICA 5.0». Сравнение вариационных рядов осуществляли с помощью непараметрического U критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции по Спирману. При статистической обработке значения цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода (< 2 пг/мл), принимались за 1 пг/мл.

## Результаты

Для оценки цитокинового профиля у больных ХВГ с фиброзом и циррозом печени исследовали концентрацию цитокинов, характеризующих баланс Th1/Th2 (IFN-γ/IL-4, IL-13), а также про- и противовоспалительную активность моноцитов (TNF-α/IL-10). Чтобы избежать дополнительной активации клеток во время выделения МНК, а также возможной дегградации цитокинов в результате повышенной активности протеолитических ферментов, концентрацию цитокинов измеряли в 24-часовых культурах клеток цельной крови. Кроме того, поскольку течение ХВГ на стадии формирования фиброза и цирроза зачастую сопровождается изменением абсолютного количества циркулирующих лимфоцитов и моноцитов, концентрацию цитокинов оценивали в пересчете на 1x10<sup>6</sup> МНК.

По сравнению со здоровыми донорами (табл. 1) у обследованных больных отмечалось усиление спонтанной продукции как Th1/провоспалительных, так и Th2/противовоспалительных цитокинов. Наиболее выраженные изменения отмечались в отношении IFN-γ, TNF-α и IL10, уровень которых превышал аналогичные показатели доноров в 5-8 раз. Несмотря на одновременное возрастание Th1- и Th2-цитокинов, увеличение IFN-γ было более выраженным, чем IL-4 или IL-13. Поэтому индекс соотношения IFN-γ/IL-4 у больных был достоверно выше, чем у здоровых доноров (5,5 ± 0,5 vs 3,5 ± 0,3; p<0,05). В то же время соотношение TNF-α/IL-10 в целом по группе больных значимо не отличалось от донорских значений (данные не представлены).

LPS стимуляция клеток крови здоровых доноров приводила к существенному усилению продукции IFN-γ, TNF-α и IL-10, умеренному увеличению уровня IL-4 и незначительному усилению синтеза IL-13. В группе больных концентрация IFN-γ, TNF-α и IL-10 в LPS-стимулированных культурах также возрастала, достоверно превышая при этом уровень аналогичных показателей в контрольной группе. В то же время прироста продукции IL-4 и IL-13 в ответ на стимуляцию LPS у больных не наблюдалось. Тем не менее, концентрация этих цитокинов в стимулированных культурах значимо превышала соответ-

Табл. 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОНТАННОЙ И LPS-СТИМУЛИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ (пг/мл/10<sup>6</sup>МНК) КЛЕТКАМИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ХВГ С ФИБРОЗОМ И ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

Цитокины	Доноры (n=20)			Больные (n=23)		
	0	LPS	ICLPS	0	LPS	IC <sub>LPS</sub>
IFN-γ	196 ± 36	556 ± 34	9,3 ± 2,7	990 ± 197**	2251 ± 374**	3,2 ± 0,6*
IL-4	54 ± 9,6	70 ± 8	2,6 ± 0,6	164 ± 19**	196 ± 21**	1,4 ± 0,1
IL-13	19 ± 3	26 ± 3	1,5 ± 0,1	41 ± 5**	42 ± 5*	1,1 ± 0,06
TNF-α	88 ± 14	2627 ± 504	42 ± 9	698 ± 284**	7277 ± 201*	28 ± 8,8
IL-10	59 ± 13	1273 ± 325	29 ± 10	483 ± 172**	6851 ± 1177**	31 ± 5,3

Примечание. Результаты представлены в виде M ± S.E. \* - p<sub>0</sub> < 0,05; \*\* - p<sub>0</sub> < 0,01; достоверность различий по сравнению с группой доноров (U- критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). ИС<sub>LPS</sub> – индекс стимуляции LPS.

ствующие значения здоровых доноров. Сравнение стимулирующего эффекта LPS на продукцию различных цитокинов выявило достоверное снижение индекса стимуляции IFN- $\gamma$  и тенденцию к снижению ИС<sub>LPS</sub> TNF- $\alpha$  и IL-4. В то же время, несмотря на высокую спонтанную продукцию IL-10, индуцибельность данного цитокина при стимуляции LPS оставалась сохранной. Таким образом, больные ХВГ с наличием фиброза и цирроза печени характеризуются повышенным уровнем продукции цитокинов из функционально оппозиционных групп. При этом усиление спонтанного синтеза цитокинов может указывать на состояние преактивированности МНК *in vivo*, а увеличение индекса соотношения IFN- $\gamma$ /IL-4 в нестимулированных культурах – на более выраженную активацию Th1. В свою очередь, прирост продукции TNF- $\alpha$ /IL-10 в ответ на стимуляцию LPS свидетельствует о сохранной реактивности мононуклеарных фагоцитов крови к эндотоксину.

Чтобы выяснить, насколько изменения цитокинового профиля ассоциированы с выраженностью фиброза, сравнительный анализ продукции цитокинов был проведен отдельно в подгруппах больных с фиброзом и циррозом печени (табл. 2). Усиление спонтанной и LPS-индуцированной продукции цитокинов отмечалось в обеих группах больных, однако выраженность и характер изменений имели свои особенности. Так, у пациентов с фиброзом усиление спонтанной продукции IFN- $\gamma$  не сопровождалось достоверным возрастанием IL-4 и IL-13. В то же время у больных циррозом отмечалось увеличение синтеза как Th1, так и Th2 цитокинов, при этом уровень продукции IFN- $\gamma$ , IL-4 и IL-13 был достоверно выше, чем у больных с фиброзом печени. Что касается про- и противовоспалительных цитокинов, в обеих подгруппах наблюдалось усиление спонтанной продукции как TNF- $\alpha$ , так и IL-10. Тем не менее, концентрация этих цитокинов у больных циррозом печени была значимо выше, чем у больных с фиброзом. При анализе LPS-стимулированной продукции различия между группами были менее выраженными и обнаруживались только в отношении IL-4 и IL-13, уровень которых при циррозе печени повышался в среднем в 2 раза. В то же время сред-

ние значения IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-10 в LPS-стимулированных культурах, достоверно превышая таковые у доноров, не различались между группами больных с фиброзом и циррозом печени. Таким образом, трансформация фиброза в цирроз печени ассоциировалась с повышением спонтанной и LPS-индуцированной продукции Th2 цитокинов (IL-4, IL-13) в сочетании с дальнейшим увеличением уровня Th1 (IFN- $\gamma$ ), про- и противовоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ /IL-10).

Известно, что TNF- $\alpha$ , будучи провоспалительным цитокином, способен оказывать выраженное повреждающее действие на гепатоциты, индуцировать воспалительную реакцию и активировать звездчатые клетки, стимулируя таким образом их профиброгенную активность. В свою очередь IL-10 ингибирует активацию звездчатых клеток и проявляет антифиброгенные свойства [8]. Поэтому, уровень и баланс продукции этих цитокинов может предопределять тяжесть цирроза, обусловленную, с одной стороны, активностью воспалительного процесса в печени, а с другой – выраженностью и распространенностью фиброзного процесса. Действительно, анализ продукции указанных цитокинов по мере прогрессии цирроза выявил ряд закономерностей. Так, у больных с классом В и С продукция указанных цитокинов была выше, чем в подгруппе с классом А, хотя различия в силу малых выборок были недостоверны. Обращало также внимание, что у больных с классом А концентрация IL-10 в LPS-стимулированных культурах превышала уровень TNF- $\alpha$ , в то время как у больных с классом С уровень TNF- $\alpha$  был выше, чем IL-10. В результате индекса соотношения TNF- $\alpha$ /IL-10 у больных класса С достоверно превышал таковой у пациентов класса А ( $2,3 \pm 0,6$  vs  $0,6 \pm 0,2$ ;  $p_U=0,05$ ). Преобладание провоспалительных цитокинов и увеличение индекса соотношения TNF- $\alpha$ /IL-10 выявлялось только у больных класса С и не отмечалось у пациентов с циррозом печени класса В. Таким образом, прогрессия цирроза (трансформация процесса в класс С) сопряжена с изменением баланса TNF- $\alpha$ /IL-10 в сторону доминирования TNF- $\alpha$ . Сходные закономерности выявлялись при анализе индекса со-

Табл. 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОНТАННОЙ И LPS-СТИМУЛИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ (пг/мл/10<sup>6</sup>МНК) В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ ХВГ С НАЛИЧИЕМ ФИБРОЗА И ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

Цитокины	Фиброз (n=7)		Цирроз (n=16)	
	0	LPS	0	LPS
IFN- $\gamma$	414 $\pm$ 64 #	1479 $\pm$ 408 ##	1242 $\pm$ 260 # *	2588 $\pm$ 491 ##
IL-4	88 $\pm$ 6	122 $\pm$ 14 #	198 $\pm$ 23 # **	228 $\pm$ 25 ## **
IL-13	21 $\pm$ 2,7	22 $\pm$ 2,5	49 $\pm$ 6,5 # *	51 $\pm$ 6,4 ## *
TNF- $\alpha$	180 $\pm$ 37 #	6130 $\pm$ 2756 #	924 $\pm$ 398 # *	7778 $\pm$ 2681 #
IL-10	126 $\pm$ 9 #	5027 $\pm$ 1284 ##	404 $\pm$ 103 # *	7648 $\pm$ 1579 ##

Примечание: #  $p_U < 0,05$ ; ##  $p_U < 0,01$  – достоверность различий со здоровыми донорами; \* -  $p_U < 0,05$ ; \*\* -  $p_U < 0,01$ ; достоверность различий по сравнению с группой больных с фиброзом (U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

отношения IFN- $\gamma$ /IL-10, который у больных класса С был достоверно выше, чем у пациентов класса А ( $2,3 \pm 1,1$  vs  $0,3 \pm 0,08$ ;  $p_U=0,05$ ). Таким образом, утяжеление цирроза печени сопряжено с более выраженным нарастанием Th1/провоспалительных цитокинов и недостаточным уровнем IL-10, то есть с изменением баланса факторов с про- и антифиброгенной активностью.

Дополнительные аргументы в пользу усиления провоспалительной активности по мере прогрессии цирроза были получены при анализе корреляционной зависимости между индексом TNF- $\alpha$ /IL-10, баллом тяжести цирроза печени и выраженностью цитолиза. Так, показатель соотношения TNF- $\alpha$ /IL-10 у больных циррозом печени прямо коррелировал с баллом тяжести по шкале Child-Pugh ( $r_s=0,62$ ;  $p<0,05$ ), а также находился в прямой взаимосвязи с уровнем АЛТ ( $r_s=0,55$ ;  $p=0,006$ ) и АСТ ( $r_s=0,44$ ;  $p=0,03$ ), отражающих интенсивность цитолиза гепатоцитов. В свою очередь, между баллом по шкале Child-Pugh и индексом LPS-стимуляции IL-10 выявлялась обратная взаимосвязь ( $r_s= -0,48$ ;  $p=0,04$ ), что указывало на прогрессирующее снижение индуцибельности данного цитокина по мере нарастания степени тяжести цирроза. Характерно, что уровень спонтанной продукции IL-10 обратно коррелировал с индексом гистологической активности ( $r_s= -0,72$ ;  $p=0,027$ ), отражающим выраженность локального воспаления в печени. Таким образом, продукция IL-10 в периферической крови является маркером, в определенной степени отражающим негативную регуляцию воспалительного процесса в печени.

Течение ХГВ у больных с фиброзом и циррозом печени характеризуется многочисленными внепеченочными проявлениями, одним из которых является патология системы крови и, в частности, анемия. Развитие анемии при хронических воспалительных заболеваниях во многом обусловлено иммунными

механизмами, в том числе повышенным уровнем провоспалительных цитокинов, способных прямо или опосредованно вызывать изменения метаболизма железа, пролиферации эритроидных предшественников, продукции эритропоэтина и продолжительности жизни эритроцитов [27]. Поэтому в завершение был проведен анализ особенностей продукции цитокинов у больных циррозом печени с наличием и отсутствием анемии. Анемию диагностировали при снижении уровня гемоглобина ниже 120 г/л у женщин и 130 г/л у мужчин. Анемия не выявлялась у пациентов ХВГ с фиброзом, но диагностировалась у 8 из 16 обследованных больных с циррозом печени. Как следует из данных таблицы 3, пациенты с циррозом печени из опозитных подгрупп были сопоставимы по полу, возрасту, тяжести цирроза, индексу гистологической активности и уровню трансаминаз. Тем не менее, несмотря на однородность групп, больные с анемией характеризовались достоверно повышенной спонтанной продукцией IFN- $\gamma$  и IL-4. Кроме того, у этих больных обнаруживалась отчетливая тенденция к снижению уровня продукции IL-10. В результате индекс соотношения IFN- $\gamma$ /IL-10 у больных с анемией двукратно превышал таковой у пациентов без анемии. Кроме того, между концентрацией гемоглобина в крови и интенсивностью LPS-стимулированной продукции IL-10 у больных циррозом печени ( $n=16$ ) выявлялась прямая корреляционная связь ( $r_s=0,5$ ;  $p=0,04$ ).

Интересно отметить, что в целом по группе обследованных больных с фиброзом и циррозом печени уровень гемоглобина обратно коррелировал с индексом гистологической активности ( $r_s= -0,69$ ,  $p=0,002$ ) и уровнем АСТ ( $r_s= -0,54$ ;  $p=0,007$ ). Таким образом, развитие анемии ассоциировалось с усилением воспалительной активности в периферической крови, а также с выраженностью локального воспаления в печени.

Табл. 3. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ АНЕМИИ

Параметры	Больные циррозом печени (n=16)	
	Без анемии (n=8)	С анемией (n=8)
Уровень гемоглобина (г/л)	139 $\pm$ 4,5	110 $\pm$ 5,8 **
Возраст (лет)	33,6 $\pm$ 3,4	42,6 $\pm$ 4,3
Пол (м/ж)	4/4	5/3
Балл тяжести цирроза	8,3 $\pm$ 0,9	8,9 $\pm$ 0,78
Индекс гистологической активности	11,0 $\pm$ 1,7	11,8 $\pm$ 1,6
АСТ (Ммоль/л)	1,6 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,2
АЛТ (Ммоль/л)	2,6 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,4
IFN- $\gamma$ (пг/мл/10 <sup>6</sup> МНК)	743 $\pm$ 180	1740 $\pm$ 431 *
IL-4 (пг/мл/10 <sup>6</sup> МНК)	148 $\pm$ 31	247 $\pm$ 25 *
IL-13 (пг/мл/10 <sup>6</sup> МНК)	38 $\pm$ 8	60 $\pm$ 8
TNF- $\alpha$ (пг/мл/10 <sup>6</sup> МНК)	613 $\pm$ 263	1235 $\pm$ 763
IL-10 (пг/мл/10 <sup>6</sup> МНК)	542 $\pm$ 229	326 $\pm$ 31
IFN- $\gamma$ /IL-10	2,5 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 1,6 *

Примечание. \* -  $p_U < 0,05$ ; \*\* -  $p_U < 0,01$ ; достоверность различий по сравнению с группой больных без анемии (U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

## Обсуждение

Процесс фиброгенеза при хронических вирусных гепатитах является ответной реакцией организма на повреждение печени, которая инициируется и поддерживается хроническим воспалительным процессом [3]. Развитие фиброза связано с избыточным отложением соединительной ткани в результате усиления продукции и нарушения деградации белков внеклеточного матрикса. Наибольшую роль в развитии фиброза отводят локальным механизмам, в частности, звездчатым клеткам, способным при активации продуцировать коллаген и ингибиторы металлопротеиназ (ферментов деградации коллагена). Активация звездчатых клеток в зоне воспаления инициируется активными метаболитами кислорода. При этом процесс фиброгенеза находится под сложным контролем цитокинов и ростовых факторов, продуцируемых макрофагами, звездчатыми клетками, лимфоцитами и нейтрофилами, в том числе рекрутируемыми из периферической крови. Системные факторы также могут существенно влиять на интенсивность фиброгенеза. Например, возрастание TNF- $\alpha$  и других провоспалительных цитокинов в крови сопровождается усилением экспрессии мРНК проколлагена и тканевых ингибиторов металлопротеиназ в печени [3, 8, 7]. Поскольку МНК периферической крови являются источником лимфоцитов и макрофагов, инфильтрирующих ткань печени, а также отражают изменения на системном уровне, исследование взаимосвязи репертуара цитокинов, продуцируемых клетками крови, с особенностями фиброгенеза и тяжестью цирроза печени при хронической вирусной инфекции представляет большой интерес.

Полученные нами в целом данные показали, что течение ХВГ у больных с фиброзом и циррозом печени ассоциировано с выраженным усилением цитокин-продуцирующей функции клеток периферической крови. При этом регистрируется одновременное возрастание как Th1/про-, так и Th2/противовоспалительных цитокинов. Усиление продукции IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  является отражением воспалительного компонента и может быть обусловлено активацией иммунной системы вирусными антигенами в условиях персистенции вируса, а также присутствующим в кровотоке больных эндотоксином [6], являющимся мощным активатором моноцитов и макрофагов. Действительно, циркулирующие моноциты при хронической вирусной инфекции имеют признаки активации, что проявляется усилением экспрессии на их поверхности CD69 и CD14 антигенов [29]. Активированные моноциты/макрофаги за счет продукции метаболитов кислорода и TNF- $\alpha$  способны оказывать прямое гепатотоксическое действие. Кроме того, через продукцию иммунорегуляторных цитокинов и презентацию антигена они мо-

гут участвовать в запуске и регуляции антигенспецифического ответа.

Выявленное нами усиление спонтанной продукции цитокинов также свидетельствует о состоянии преактивированности иммунокомпетентных клеток *in vivo*. Вместе с тем важно отметить, что, несмотря на увеличение продукции Th1/провоспалительных цитокинов, клинической манифестации системного воспалительного ответа у обследованных пациентов не наблюдалось. Теоретически это может быть обусловлено индукцией LPS-толерантности и/или включением компенсаторного противовоспалительного ответа. Учитывая значимый прирост продукции TNF- $\alpha$  в LPS-стимулированных культурах, а с другой стороны, повышенный уровень продукции IL-10, можно полагать, что отсутствие системной воспалительной реакции не связано с развитием эндотоксиновой толерантности, и, скорее всего, обусловлено запуском противовоспалительных цитокинов. Одновременное возрастание TNF- $\alpha$  и противовоспалительных медиаторов, в том числе IL-10 в плазме и в культурах клеток крови выявлено von Baehr V. с соавт. при алкогольном циррозе, на основании чего авторы объясняют отсутствие системных проявлений воспаления сбалансированным увеличением противовоспалительных медиаторов [26]. Учитывая антифиброгенный эффект IL-10 [8], можно также полагать, что его увеличение служит не только ограничением воспалительного ответа, но и является своего рода механизмом feed-back регуляции прогрессирующего фиброза.

Важно отметить, что наряду с возрастанием IL-10, обследуемые нами пациенты имели повышенный уровень спонтанной продукции IL-4 и IL-13. Данные цитокины могут продуцироваться Th2 и NKT-клетками, но в отличие от IL-10 обладают выраженными профиброгенными свойствами [13, 22]. Причем их профиброгенный эффект может как быть обусловлен стимуляцией продукции TGF- $\beta$ , так и реализоваться за счет TGF- $\beta$  независимого механизма [11]. Таким образом, судя по полученным результатам, активация функционально оппозитных групп цитокинов у больных ХВГ на стадии формирования фиброза и цирроза печени является отражением сложного комплекса событий, в частности иммунного ответа на персистенцию вирусных и бактериальных антигенов, хронической воспалительной реакции и фиброза, а также запуска механизмов feed-back регуляции.

Несмотря на то, что циркулирующие МНК являются источником клеток, инфильтрирующих печень, вопрос о том, насколько изменение цитокинового профиля клеток крови отражает выраженность воспаления и фиброза в печени, а также тяжесть цирроза, остается дискуссионным. Проведенный нами сравнительный анализ уровня цитокинов в группах больных ХВГ с фиброзом и циррозом печени показал, что трансформация в цирроз связана, во-

первых, с повышением спонтанной продукцией IL-4 и IL-13 (чего не наблюдается у больных с фиброзом), а, во-вторых, - с дальнейшим нарастанием продукции IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-10. Утяжеление цирроза ассоциируется с дальнейшим прогрессирующим увеличением спонтанной продукции анализируемых цитокинов. При этом переход в терминальную стадию (класс C) сопряжен с изменением баланса стимулированной продукции про- и противовоспалительных цитокинов, что проявляется достоверным увеличением индексов соотношения TNF- $\alpha$ /IL-10 и IFN- $\gamma$ /IL-10. Из этого следует, что тяжесть цирроза в значительной степени определяется выраженностью воспалительного компонента и ослаблением противовоспалительной активности. Это подтверждается наличием прямой корреляционной связи индекса TNF- $\alpha$ /IL-10 с интенсивностью цитолиза и баллом тяжести цирроза (по Child-Pugh) и наличием обратной связи между тяжестью цирроза и индексом LPS-стимуляции IL-10.

Выявленная нами сопряженность между сдвигом баланса в сторону провоспалительных цитокинов с активностью цитолиза и тяжестью цирроза является важным аргументом, обосновывающим необходимость противовоспалительной терапии в лечении больных. Действительно, подавление воспаления рассматривается как один из важных патогенетических подходов к лечению больных с фиброзом и циррозом печени [7]. Так, в экспериментальных моделях на животных показано, что ингибция продукции TNF- $\alpha$  с помощью пентоксифилина или моноклональных антител характеризуется выраженным антифибротическим эффектом [20, 10]. Возможность использования моноклональных антител к TNF- $\alpha$  апробирована в лечении тяжелых форм алкогольного гепатита [24]. Другой подход связан с использованием IL-10. Противовоспалительный и антифибротический эффект IL-10 показан на модели CCl<sub>4</sub>-индуцированного цирроза печени у крыс [14]. Кроме того, недавно были успешно проведены пилотные исследования IL-10 у человека. Длительное использование IL-10 (не менее 12 недель) у больных с хронической HCV-инфекцией сопровождалось снижением уровня АЛТ, индекса гистологической активности и выраженности фиброза, что свидетельствует об антифибротическом эффекте проводимой противовоспалительной терапии [18].

Одним из интересных вопросов является изучение роли цитокинов в нарушении процессов кроветворения. Как известно, большинство хронических воспалительных заболеваний протекает с развитием анемии, которая, безусловно, отражается на качестве жизни больных [27]. В нашем исследовании анемия не выявлялась у больных с фиброзом, но регистрировалась у половины (8/16) больных с циррозом печени. Анемию при хроническом воспалении во многом связывают с повышенной продукцией

провоспалительных цитокинов. Действительно, провоспалительные цитокины способны вызывать нарушения в обмене железа, а также оказывать прямой ингибирующий эффект на эритропоэз [27, 2, 15]. С другой стороны, недавно появились факты о роли противовоспалительных цитокинов в нарушении гемопоэза. Например, было установлено, что IL-4 и IL-13 усиливают захват и удержание железа в макрофагах, приводя, таким образом, к снижению его концентрации в сыворотке [28]. Имеются также данные об участии IL-10 в развитии анемии при болезни Крона, в частности способности IL-10 стимулировать образование ферритина и тем самым снижать утилизацию железа эритроидными клетками, что необходимо для синтеза гемоглобина [25].

Полученные нами данные показали, что у больных с анемией индекс соотношения IFN- $\gamma$ /IL-10 в 2 раза превышал таковой у пациентов оппозитной группы. С другой стороны, концентрация гемоглобина у больных циррозом печени прямо коррелировала с уровнем индуцированной продукции IL-10. Следовательно, на фоне усиления продукции оппозитных групп цитокинов анемия у больных циррозом печени ассоциирована все-таки со смещением баланса в сторону провоспалительных цитокинов. Важно отметить, что подгруппы больных с наличием и отсутствием анемии были сходны по всем прочим параметрам – полу/возрасту, баллу тяжести цирроза печени, уровню АСТ и даже индексу гистологической активности. Поэтому выявленное в подгруппе с анемией увеличение соотношения IFN- $\gamma$ /IL-10 указывает на то, что уже само по себе изменение баланса цитокинов в периферической крови при равной выраженности воспалительного процесса в печени может быть важным фактором, ассоциированным с развитием анемии. С другой стороны, обратная взаимосвязь уровня гемоглобина с индексом гистологической активности и АСТ в целом по группе обследованных больных с фиброзом и циррозом показывает, что выраженность локального воспаления в печени также является фактором сопряженности с анемией. Следовательно, можно полагать, что проведение противовоспалительной терапии, направленной на подавление воспалительной активности МНК крови и локального воспаления в печени будет способствовать не только подавлению воспаления и фиброза, но и положительным образом сказываться на восстановлении кроветворения.

## Список литературы

1. Abayli B., Canataroglu A., Akkiz H. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection // Turk. J. Gastroenterol. - 2003. - Vol. 1. - P. 7-11.
2. Andrews N. C. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link // J. Clin. Invest. - 2004. - Vol. 113. - P. 1251-1253.

3. Bataller R., Brenner D.A. Liver fibrosis // *Clin. Invest.* - 2005. - Vol. 115. - P. 209-218.
4. Bertolotti A., Maini M.K. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? // *Curr. Opin. Immunol.* - 2000. - Vol. 12. - P. 403-408.
5. Chisari F.V., Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis // *Springer Semin Immunopathol.* - 1995. - Vol. 13. - P. 29-60.
6. Cirera I., Bauer T.M., Navasa M. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis // *J. Hepatol.* - 2001. - Vol. 34. - P. 32-37.
7. Iredale J.P. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments // *BMJ.* - 2003. - Vol. 327. - P. 143-147.
8. Friedman S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury // *J. Biol. Chem.* - 2000. - Vol. 275. - P. 2247-2250.
9. Gilles P.N., Fey G., Chisari F.V. Tumor necrosis factor alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice // *J. Virol.* - 1992. - Vol. 66. - P. 3955-3960.
10. Iimuro Y., Gallucci R.M., Luster M.I., Kono H., Thurman R.G. Antibodies to tumor necrosis factor- $\alpha$  attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat // *Hepatology.* - 1997. - Vol. 26. - P. 1530-1537.
11. Kaviratne M., Hesse M., Leusink M., Cheever A.W., Davies S.J., McKerrow J.H., Wakefield L.M., Letterio J.J., Wynn T.A. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF- $\beta$  independent. // *J. Immunol.* - 2004. - Vol. 173. - P. 4020-4029.
12. Kirschmann D.A., He X., Murasko D.M. Inhibition of macrophage-induced, antigen-specific T-cell proliferation by poly I: role of suppressor macrophages // *Immunology.* - 1994. - Vol. 82. - P. 238-243.
13. Lalla C., Galli G., Aldrighetti L., Romeo R., Mariani M., Monno A., Nuti N., Colombo M., Callea F., Porcelli S.A., Panina-Bordignon P., Abrignani S., Casorati G., Dellabona P. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis // *J. Immunol.* - 2004. - Vol. 173. - P. 1417-1425.
14. Louis H., Van Laethem J.L., Wu W., Quertinmont E., Degraef C., Van den Berg K., Demols A., Goldman M., Le Moine O., Geerts A., Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice // *Hepatology.* - 1998. - Vol. 28. - P. 1607-1615.
15. Ludwiczek S., Aigner E., Theurl I., Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells // *Blood.* - 2003. - Vol. 101. - P. 4148-4154.
16. Montaner L.J., da Silva R.P., Sun J., Sutterwala S., Hollinshead M., Vaux D., Gordon S. Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophages endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN- $\gamma$  or IL-10 // *J. Immunol.* - 1999. - Vol. 162. - P. 4606-4613.
17. Napoli J., Bishop G.A., McGuinness P.H. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines // *Hepatology.* - 1996. - Vol. 24. - P. 759-765.
18. Nelson D.R., Tu Z., Soldevila-Pico C., Abdelmalek M., Zhu H., Xu Y.L., Cabrera R., Liu C., Davis G.L. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect // *Hepatology.* - 2003. - Vol. 38. - P. 859-868.
19. Peters M. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview // *Hepatology.* - 1996. - Vol. 23. - P. 909-916.
20. Raetsch C., Jia J.D., Boigk G., Bauer M., Hahn E.G., Riecken E-O., Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis // *Gut.* - 2002. - Vol. 50. - P. 241-247.
21. Romagnani S., Parronchi P., D'Elia M.M., Romagnani P., Annunziato F., Piccinni M.P., Manetti R., Sampognaro S., Mavilia C., De Carli M., Maggi E., Del Prete G.F. An update on human Th1 and Th2 cells // *Int. Arch. Allergy. Immunol.* - 1997. - Vol. 113. - P. 153-156.
22. Sobue S., Nomura T., Ishikawa T., Ito S., Saso K., Ohara H., Joh T., Itoh M., Kakumu S. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection // *J. Gastroenterol.* - 2001. - Vol. 36. - P. 544-551.
23. Sun Q.-L., Ran W. Review of cytokine profiles in patients with hepatitis // *World J. Gastroenterol.* - 2004. - Vol. 15. - P. 1709-1715.
24. Tilg H., Jalan R., Kaser A., Davies N.A., Offner F.A., Hodges S.J. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis // *J. Hepatol.* - 2003. - Vol. 38. - P. 419-425.
25. Tilg H., Ulmer H., Kaser A., Weiss G. Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation // *J. Immunol.* - 2002. - Vol. 169. - P. 2204-2209.
26. von Baehr V., Docke W.D., Plauth M., Liebenthal C., Kupferling S., Lochs H., Baumgarten R., Volk H.D. Mechanisms of endotoxin tolerance in patients with alcoholic liver cirrhosis: role of interleukin 10, interleukin 1 receptor antagonist, and soluble tumor necrosis factor receptors as well as effector cell desensitization // *Gut.* - 2000. - Vol. 47. - P. 281-287.
27. Weiss G., Goodnough L. T. Anemia of chronic disease // *N. Engl. J. Med.* - 2005. - Vol. 352. - P. 1011-1023.
28. Weiss G., Bogdan C., Hentze M.W. Pathways for the regulation of macrophage iron metabolism by the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 // *J. Immunol.* - 1997. - Vol. 158. - P. 420-426.
29. Wel R., Chen B., Gan T.F., Zhou X.M., Zhang Y.Q., Ren D.L. Application of flow cytometry to analyzing the activation states of peripheral blood mononuclear cells CD14 macrophage // *Chin. J. Lab. Med.* - 2003. - Vol. 26. - P. 1-4.

поступила в редакцию 22.02.2006  
принята к печати 01.04.2006