# МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

**Останин А.А., Старостина Н.М., Меледина И.В., Шипунов М.В., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Черных Е.Р.**

*Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

**Резюме.** Цитокины играют важную роль в патогенезе цирроза печени (ЦП), детерминируя тяжесть заболевания, развитие печеночных и внепеченочных осложнений. Целью исследования являлся мультиплексный анализ 26 цитокинов, секретируемых клетками крови больных ЦП (n = 20) с учетом стадии (класс А по Child-Pugh, n = 13 и класс В+С, n = 7) и этиологии заболевания (вирусный ЦП, n = 12 и ЦП невирусной этиологии, n = 8). Группу контроля составили 10 здоровых доноров крови. Цитокин-секреторную функцию клеток оценивали в 24-часовых культурах как на уровне спонтанной продукции, так и в ответ на стимуляцию бактериальным эндотоксином (ЛПС). При анализе цитокинов, вовлеченных в патогенез воспалительного процесса, было выделено 4 функциональные группы: про-/противовоспалительные цитокины (IL-1β, TNFα, IL-1ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFNγ, IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF-β, PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, Eotaxin). В работе показано, что клетки крови больных ЦП являются активными продуцентами цитокинов и характеризуются повышенной секрецией цитокинов из всех 4 функциональных групп. Усиление продукции многих цитокинов ассоциировано с тяжестью ЦП и вирусной этиологией ЦП. При этом возрастание как спонтанной, так и ЛПС-стимулированной секреции цитокинов свидетельствует о сохранной реактивности клеток крови к эндотоксину. В целом полученные данные свидетельствуют о важном вкладе циркулирующих клеток крови в поддержании воспалительного ответа при ЦП и потенциальной диагностической/прогностической значимости цитокинов, продуцируемых клетками крови.

*Ключевые слова: мультиплексный анализ, цитокины, хемокины, ростовые факторы, клетки крови, цирроз печени*

# A MULTIPLEX ASSAY OF 26 CYTOKINES SECRETED BY BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS

**Ostanin A.A., Starostina N.M., Meledina I.V., Shipunov M.V., Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Chernykh E.R.**

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

**Abstract.** Cytokines play an important role in the pathogenesis of liver cirrhosis (LC), determining the disease severity as well as hepatic and extrahepatic complications. The present study aims to characterize the

**Адрес для переписки:**

*Останин Александр Анатольевич
Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии
630099, Россия, г. Новосибирск, Ядринцевская ул., 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru*

**Address for correspondence:**

*Ostanin Alexander A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru*

**Образец цитирования:**

*А.А. Останин, Н.М. Старостина, И.В. Меледина, М.В. Шипунов, О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных, «Мультиплексный анализ 26 цитокинов, секретируемых клетками крови больных циррозом печени» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 539-552.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-539-552*

**For citation:**

*A.A. Ostanin, N.M. Starostina, I.V. Meledina, M.V. Shipunov, O.Yu. Leplina, E.Ya. Shevela, E.R. Chernykh, "A multiplex assay of 26 cytokines secreted by blood cells of patients with liver cirrhosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 539-552.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-539-552*

© *Останин А.А. и соавт., 2015*

**DOI:** http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-539-552

cytokine profile of blood cells in 20 LC patients with regard to the stage (class A on Child-Pugh, n = 13, and the class B+C, n = 7) and the etiology of the disease (viral LC, n = 12 and the LC of non-viral etiology, n = 8) using cytokine 26-plex assay. The control group consisted of 10 healthy donors. Cytokine concentrations were tested both in spontaneous and bacterial endotoxin (LPS) stimulated 24 hour blood cultures. Four functional groups: pro-/anti-inflammatory cytokines (IL-1β, TNFα, IL-1ra, IL-10), immunoregulatory cytokines (IL-2, IFNγ, IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), growth factors (G-CSF, IL-7, FGF-β, PDGF, VEGF) and chemokines (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, Eotaxin) involved in the pathogenesis of inflammation, have been analyzed. The blood cells of LC patients were shown to be active producers of cytokines and were characterized by increased cytokine levels from all four functional groups. The enhancement of many cytokines was associated with the disease severity and viral etiology. The increased cytokine production in both intact and LPS-stimulated cultures indicated preserved reactivity of blood cells to endotoxin. Overall, the data obtained suggest the contribution of circulating blood cells in supporting of inflammatory response and the potential diagnostic/prognostic significance of blood cell-derived cytokines in patients with LC.

*Keywords: multiplex assay, cytokines, chemokines, growth factors, blood cells, liver cirrhosis*

## Введение

Хронические заболевания печени с исходом в цирроз относятся к группе патологий, при которых повреждение тканей связано с хроническим воспалением. Провоспалительный статус проявляется повышенным содержанием в сыворотке крови провоспалительных цитокинов и хемокинов и является характерным для больных циррозом печени (ЦП) токсической, вирусной и аутоиммунной этиологии [9, 16, 25, 29]. Воспалительный процесс инициируется и опосредуется с участием широкого спектра цитокинов, некоторые из которых могут обладать двойственной функцией, т.е. способны оказывать как протективное, так и повреждающее действие. Однако на конечной стадии хронических заболеваний повышенный уровень различных функциональных классов цитокинов связывают преимущественно с их повреждающим действием, в частности поддержанием локального и системного воспаления, апоптотической гибелью гепатоцитов, прогрессией фиброза и развитием внепеченочных осложнений [18, 25].

Источником цитокинов при ЦП являются клетки печени, включая гепатоциты, звездчатые клетки, эндотелиальные клетки, а также резидентные и рекрутируемые клетки иммунной системы (макрофаги и Т-клетки). Кроме того, значительный вклад в изменение уровня цитокинов в циркуляции могут вносить периферические клетки иммунной системы, активированные через Toll-like рецепторы (TLRs) патоген-ассоциированными молекулярными структурами в результате транслокации кишечной флоры [4, 15].

Значение воспалительного ответа в патогенезе ЦП подтверждается ассоциацией между концентрацией некоторых провоспалительных цитокинов и хемокинов с характером прогрессии и тяжестью заболевания, развитием внутрипеченочных (стеатоза, цирроза, гепатоцеллюлярной карцинормы) и внепеченочных (атеросклеорз, ишемическая болезнь сердца, когнитивные нарушения) осложнений [8, 13, 33], особенно энцефалопатии [14, 22]. Действительно, подавление TNFα у пациентов с тяжелыми формами алкогольной болезни печени с помощью пентоксифилина или моноклональных анти-TNFα антител показали клиническую эффективность [3, 31]. Соответственно, цитокины могут обладать прогностической значимостью и являться мишенями для терапевтических воздействий, что обусловливает важность их изучения при ЦП.

Несмотря на этот очевидный факт, комплексные исследования, затрагивающие одновременную оценку различных функциональных классов цитокинов, до сих пор не проводились. Это отчасти обусловлено тем, что в большинстве работ цитокины определяются в сыворотке крови, где многие из них идентифицируются на уровне пороговых значений. Поэтому анализируется весьма ограниченный спектр цитокинов, что не позволяет ответить на вопрос, имеется ли взаимосвязь между изменением отдельных функциональных групп цитокинов. Ограниченный спектр цитокинов проанализирован и в аспекте сопряженности с тяжестью и/или этиологией цирроза печени.

Поэтому настоящее исследование было посвящено комплексной характеристике различных функциональных классов цитокинов при ЦП с учетом стадии и этиологии заболевания. В качестве источника цитокинов исследовали клетки периферической крови, которые представляют физиологическую модель изучения интегрального периферического иммунного ответа *ex vivo*. Учитывая феномен транслокации

бактериальной флоры при ЦП, культуры клеток цельной крови представляются удобным источником не только для анализа спонтанной продукции цитокинов, но и для исследования феномена ЛПС-анергии [26]. Данные о реактивности моноцитов крови к повторной стимуляции эндотоксином остаются неоднозначными [20, 30], поэтому одновременная оценка спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции цитокинов клетками крови позволяет охарактеризовать их реактивность к эндотоксину.

## Материалы и методы

В исследование были включены 10 здоровых доноров крови (5 мужчин и 5 женщин, средний возраст 45 лет) и 20 больных ЦП – 10 мужчин и 10 женщин, средний возраст 50 лет. Диагноз хронического гепатита с исходом в ЦП устанавливали на основании данных клинического, лабораторного и гистологического анализа. В соответствии с классификацией цирроза печени по Child-Pugh класс А диагностировался у 13 (65%), класс В у 6 (30%) пациентов и класс С у 1 (5%) больного. Причиной ЦП в 60% случаев (12/20) являлся хронический вирусный гепатит С. Оставшиеся 40% случаев (8/20) были представлены ЦП невирусной этиологии, включая токсический ЦП (n = 4); аутоиммунный ЦП (n = 2); первичный биллиарный ЦП (n = 1); и первичный биллиарный ЦП в сочетании с аутоиммунным компонентом (n = 1). При этом следует отметить, что подгруппы больных ЦП вирусной и невирусной этиологии были сопоставимы между собой по тяжести заболевания (частота больных с ЦП класса В+С в подгруппах составляла 42 и 25% соответственно; $p_{ТМФ}$ = 0,64). Так же как и подгруппы больных с классом А и классом В+С по Child-Pugh не различались между собой по этиологии заболевания (частота больных ЦП вирусной этиологии в подгруппах составляла 54 и 71% соответственно; $p_{ТМФ}$ = 0,64). Исследования проводили после получения письменного информированного согласия больных и были одобрены решением Локального этического комитета.

Больные ЦП были обследованы до начала комплексной терапии. Забор венозной и капиллярной крови проводили утром натощак по общепринятым правилам. Общий анализ крови осуществляли на гемоанализаторе «HEMA-Screen 13» (Швейцария – Италия).

Продукцию цитокинов определяли 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-глютамина, 5мМ HEPES-буфера и 100 мкг/мл гентамицина, и культивировали в течение 24 ч в круглодонных, стерильных пробирках в присутствии липополисахарида (ЛПС, *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 °С в $CO_2$-инкубаторе, после чего собирали супернатанты и хранили полученные образцы при -80 °С до тестирования.

Концентрацию 26 цитокинов (IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, Eotaxin, FGF-basic, G-CSF, IFNγ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNFα, VEGF) в супернатантах цельной крови оценивали методом проточной флюориметрии 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 [1, 7]. Полученные значения пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества лейкоцитов и выражали в пг/мл/$10^6$ лейкоцитов.

Математическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки достоверности различий использовали точный критерий Фишера (для дискретных переменных) и непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни (для сравнения непрерывных переменных). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для оценки различий по уровню какого-либо признака между несколькими (> 2) выборками проводили дисперсионный однофакторный анализ с использованием непараметрического Н-критерия Краскела–Уоллиса.

## Результаты

Для исследования цитокин-секреторной активности клеток крови больных ЦП нами был использован методический прием, основанный на оценке уровня спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции 26 цитокинов в культурах цельной крови. Использование цельной крови имеет несколько очевидных преимуществ [32]. Во-первых, этот метод не требует выделения клеток-продуцентов, что, соответственно, устраняет вероятность их неспецифической активации на этапах сепарации. Во-вторых, оценка цитокин-секреторной функции клеток происходит в их естественном микроокружении, при котором сохраняется существующий *in vivo* баланс как различных типов клеток крови, так и гуморальных факторов. Следовательно, оценка продукции цитокинов максимально приближа-

ется к условиям *in vivo*. Тем не менее, полученные значения уровня цитокинов (пг/мл) в 24-часовых супернатантах цельной крови необходимо стандартизировать по количеству клеток-продуцентов (например, лейкоцитов), для того чтобы нивелировать различия обследуемых лиц (здоровых доноров и больных ЦП) по абсолютному лейкоцитозу.

Оценка уровня спонтанной (базальной) продукции цитокинов показала (рис. 1), что клетки крови как здоровых доноров, так и больных ЦП активно секретируют широкий спектр различных медиаторов, однако средний уровень их продукции отличается значительной вариабельностью. Так, часть цитокинов (IL-6) и хемокинов (IL-8, MCP-1, MIP-1β, RANTES) секретируется на достаточно высоком уровне (> 400 пг/мл/$10^6$ лейкоцитов). Оставшиеся хемокины (IP-10, MIP-1α, Eotaxin), а также IFNγ, отдельные ростовые факторы (PDGF), про- и противовоспалительные цитокины (IL-1β, TNFα и IL-1ra) хорошо детектируются в диапазоне от 20 до 400 пг/мл/$10^6$ лейкоцитов. При этом базальная секреция относительно большой подгруппы цитокинов и ростовых факторов (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, FGF-β, G-CSF, VEGF) не превышает уровня 20 пг/мл/$10^6$ лейкоцитов.

По сравнению со здоровыми донорами у больных ЦП отмечалась отчетливая тенденция к увеличению спонтанной продукции IL-6, TNFα и IL-1ra, а также всех хемокинов, которая в отношении MIP-1β и IP-10 достигала статистически значимого уровня ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно). Кроме того, клетки крови больных ЦП более активно секретировали IL-4, IL-5, IL-9 и FGF-β ($p < 0,05$), хотя и в этом случае уровень продукции оставался относительно низким (менее 20 пг/мл/$10^6$ лейкоцитов).

Из данных таблицы 1 видно, что повышенная спонтанная продукция MIP-1β и IP-10 обнаруживалась у больных независимо от степени тяжести или этиологии ЦП. В то же время по сравнению с донорами в подгруппе больных ЦП класса B+C дополнительно регистрировалось статистически значимое увеличение уровня секреции и других хемокинов (IL-8, RANTES, Eotaxin), а также IL-17, FGF-β и IL-9. При этом продукция IL-9 была достоверно выше не только по сравнению с донорами, но и с больными ЦП класса A.

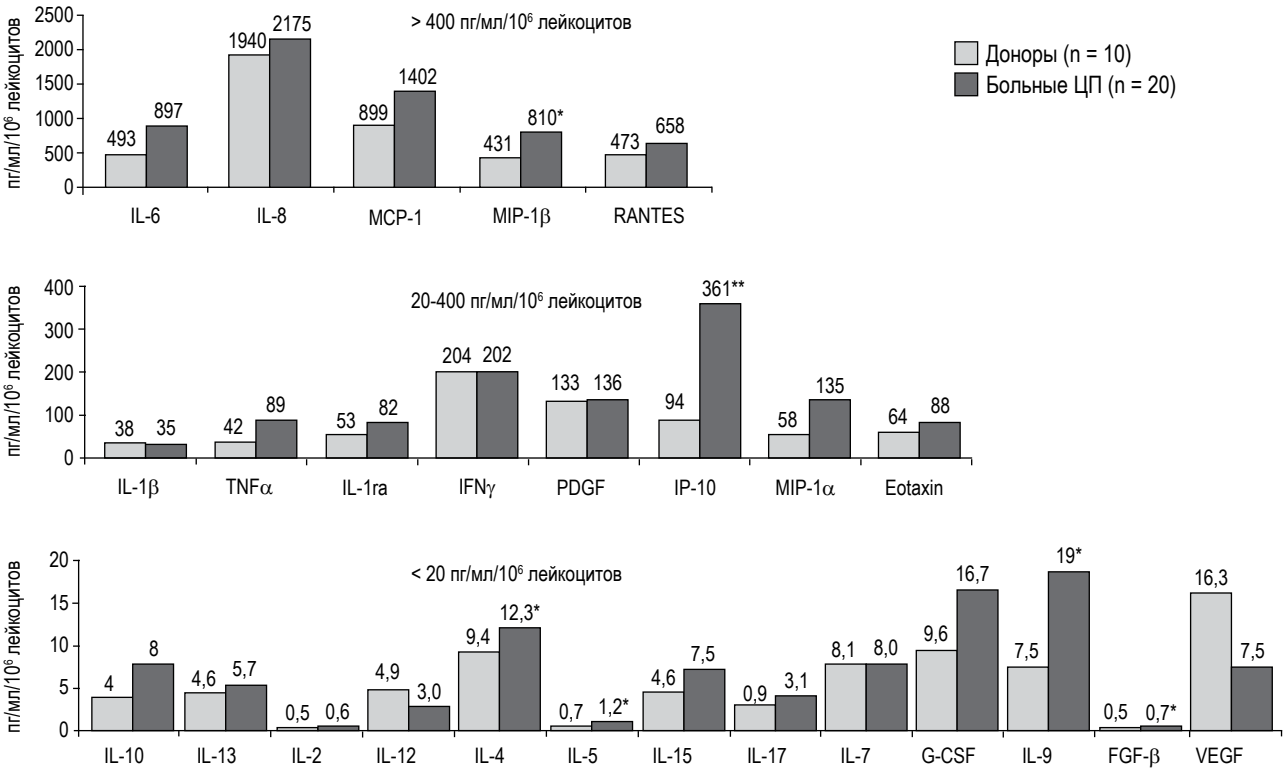


**Рисунок 1. Спонтанная продукция 26 цитокинов, секретируемых клетками крови доноров и больных ЦП**

**Примечание.** Данные представлены в виде медианных значений. * – $p_U < 0,05$ и ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия показателей больных ЦП по сравнению с донорами (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

**ТАБЛИЦА 1. СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ТЯЖЕСТИ И ЭТИОЛОГИИ ЦП**

| Группы | Цитокины | Спонтанная продукция (пг/мл/$10^6$ лейкоцитов) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Доноры (n = 10) | ЦП класс А (n = 13) | ЦП класс В+С (n = 7) | Невирусный ЦП (n = 8) | Вирусный ЦП (n = 12) |
| Про- и противо-воспалительные цитокины | IL-1β | 38 (8-59) | 29 (19-64) | 38 (6-81) | 27 (18-41) | 45 (20-82) |
| | TNFα | 42 (20-77) | 90 (40-111) | 83 (22-139) | 61 (24-89) | 103 (58-184)* |
| | IL-1ra | 53 (24-88) | 74 (44-129) | 115 (46-213) | 54 (36-106) | 110 (50-173)* |
| | IL-10 | 3,9 (3,4-8,1) | 7,9 (4,8-11,4) | 9,5 (3,9-14,4) | 4,9 (3,5-8) | 11,5 (5,1-14,7)*, # |
| Иммуно-регуляторные цитокины (Th1, Th2, Th9, Th17) | IL-2 | 0,5 (0,4-0,7) | 0,6 (0,5-0,9) | 0,7 (0,5-0,9) | 0,6 (0,5-0,7) | 0,7 (0,5-1,4) |
| | IFNγ | 204 (189-312) | 187 (109-333) | 296 (139-406) | 212 (101-314) | 201 (149-391) |
| | IL-12 | 4,9 (2,2-6,8) | 2,1 (1,4-5,0) | 3,5 (2,3-9,9) | 1,9 (1,3-4,4)* | 3,6 (2,0-20) |
| | IL-4 | 9,4 (7,7-10,8) | 12 (9,8-14,8) | 12,7 (10,4-15,8) | 10 (7,9-14,9) | 13 (10,6-16,2) |
| | IL-5 | 0,7 (0,5-0,8) | 0,9 (0,9-1,6) | 1,2 (0,8-1,5) | 1,1 (0,8-1,6) | 1,2 (0,9-1,5) |
| | IL-6 | 493 (103-939) | 789 (505-1239) | 1364 (136-1680) | 758 (379-1165) | 1091 (564-1734) |
| | IL-9 | 7,5 (6,2-11) | 15,3 (7,4-21) | 42,5 (26,4-95,5)*# | 12,4 (7,6-32) | 26,5 (11,3-44)* |
| | IL-13 | 4,6 (4-5,2) | 5,7 (3,5-8) | 5,7 (1,7-11,7) | 3,9 (2,1-5,4) | 7,0 (1,3-11,6)*, # |
| | IL-15 | 4,6 (2,5-7,6) | 8,5 (5,5-11,2) | 3,7 (1,9-12,4) | 6,0 (4,2-11,8) | 9,6 (3,6-11,4) |
| | IL-17 | 0,9 (0,5-4,9) | 3,1 (1,1-6,2) | 5,6 (1,6-27,8)* | 2,61 (1,0-3,7) | 9,2 (2,1-23,4)*, # |
| Ростовые факторы | G-CSF | 9,6 (7-31) | 9,7 (8,3-19,8) | 41,6 (3,8-66) | 12,5 (9,1-26) | 19,4 (6,5-54) |
| | IL-7 | 8,1 (1,7-11,5) | 8,4 (1,8-12,6) | 2,7 (1,5-18,2) | 7,7 (1,5-13,9) | 8,0 (1,7-14,1) |
| | FGF-β | 0,5 (0,3-0,6) | 0,7 (0,5-1,1) | 0,9 (0,6-2,8)** | 0,6 (0,3-0,8) | 1,2 (0,6-2,8)**, # |
| | PDGF | 133 (85-153) | 98 (56-193) | 183 (43-287) | 140 (41-196) | 136 (58-250) |
| | VEGF | 16,3 (1,6-36) | 8,7 (2,7-15,9) | 2,9 (2,4-74,6) | 2,6 (1,3-8,3) | 14 (3,5-63# |
| CXC- и CC-хемокины | IL-8 | 1940 (956-2193) | 1842 (1307-2459) | 3253 (1144-5046)* | 1858 (1099-3065) | 2324 (1413-4467) |
| | IP-10 | 94 (49-178) | 307 (259-1048)** | 416 (188-911)** | 283 (168-480)** | 553 (259-1039)** |
| | MCP-1 | 899 (527-1490) | 1450 (1124-2312) | 1294 (255-2028) | 1455 (830-2116) | 1402 (740-2619) |
| | MIP-1α | 58 (24-131) | 99 (84-192) | 157 (20-294) | 112 (76-151) | 175 (53-324) |
| | MIP-1β | 431 (190-507) | 786 (400-1485)* | 866 (398-2859)* | 789 (348-846)* | 1401 (580-2600)* |
| | RANTES | 473 (346-529) | 533 (337-792) | 799 (444-1076)* | 504 (429-673) | 782 (368-1123)* |
| | Eotaxin | 64 (48-77) | 74 (63-131) | 103 (83-160)* | 74 (46-127) | 95 (79-140)* |

**Примечание.** Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ-UQ). * – $p_U < 0,05$ и ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия показателей больных ЦП по сравнению с донорами; # – $p_U < 0,05$ – достоверность различия ЦП класса В+С по сравнению с классом А и ЦП вирусной этиологии по сравнению с невирусным ЦП (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

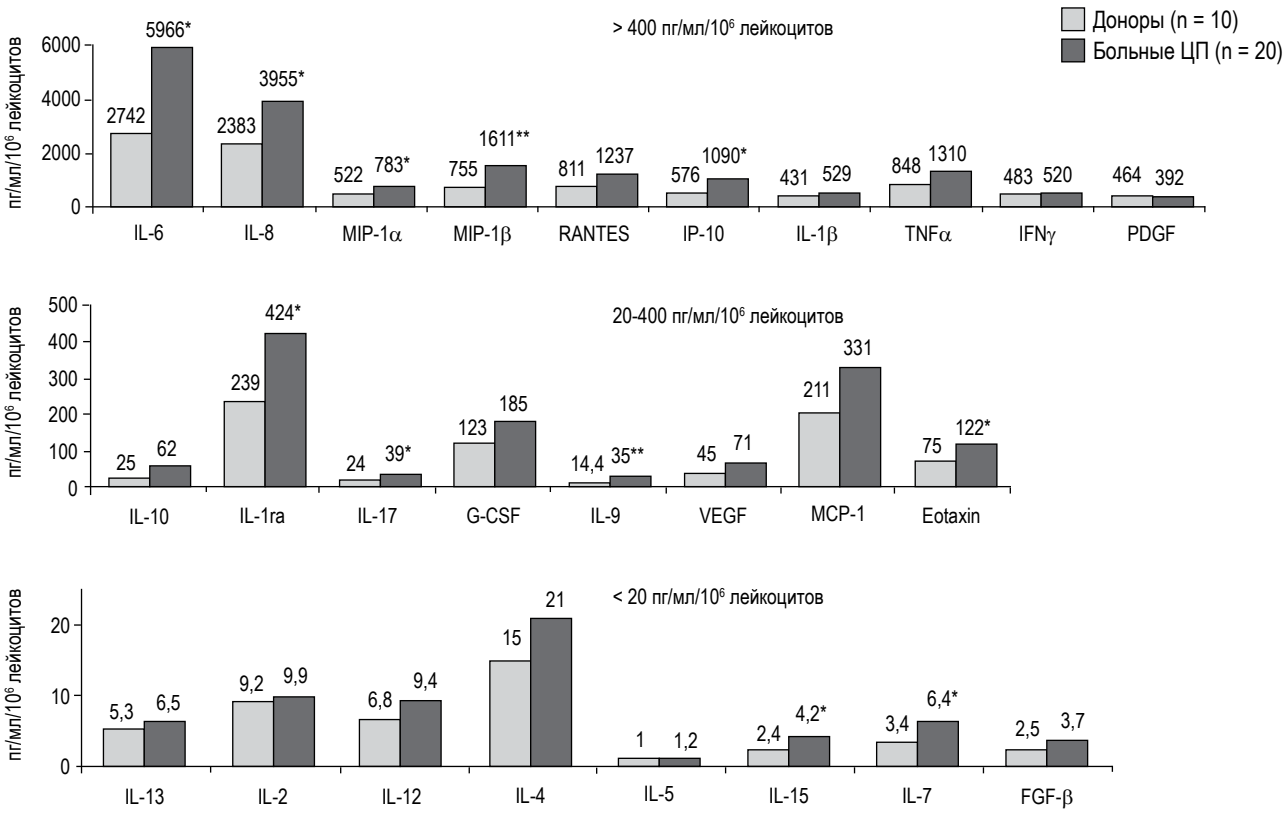


**Рисунок 2. ЛПС-индуцированная продукция 26 цитокинов, секретируемых клетками крови доноров и больных ЦП**
**Примечание.** Данные представлены в виде медианных значений. * – $p_U < 0,05$ и ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия показателей больных ЦП по сравнению с донорами (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

Изменения профиля спонтанной продукции цитокинов были также более выражены в подгруппе пациентов ЦП вирусной этиологии. Помимо высокого уровня MIP-1β и IP-10, у них регистрировался повышенный синтез клетками крови CC-хемокинов (RANTES, Eotaxin), про- (TNFα) и противовоспалительных (IL-1ra, IL-10, IL-13) цитокинов, IL-17, FGF-β и IL-9. По уровню IL-10, IL-13, IL-17 и FGF-β эти больные отличались не только от здоровых доноров, но и от больных ЦП невирусной этиологии.

Хорошо известно, что практически все гены цитокинов являются индуцибельными, поэтому наиболее ярко те или иные особенности продукции цитокинов могут быть выявлены в условиях активации клеток-продуцентов. Для того чтобы оценить функциональный резерв системы цитокинов и секреторный потенциал клеток-продуцентов в условиях митогенной стимуляции, мы использовали в качестве активатора бактериальный ЛПС (эндотоксин), поскольку данный митоген может индуцировать различные типы лейкоцитов (гранулоциты, лимфоциты, моноциты) через TLR-4. Из данных рисунка 2 видно, что суточная инкубация клеток цельной крови с ЛПС приводит к увеличению количества цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, которые секретируются на высоком (> 400 пг/мл/$10^6$ лейкоцитов) или хорошо детектируемом уровне (от 20 до 400 пг/мл/$10^6$ лейкоцитов). Тем не менее ЛПС-индуцированная продукции IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-15, IL-7 и FGF-β оставалась низкой и не превышала 20 пг/мл/$10^6$ лейкоцитов.

В целом по группе больных ЦП по сравнению с донорами в ответ на эндотоксин регистрировалось достоверное усиление синтеза IL-6, CXC- (IL-8, IP-10) и CC-хемокинов (MIP-1α, MIP-1β, Eotaxin), IL-1ra, IL-17, IL-9, IL-7 и IL-15. При этом отмечалась тенденция к усилению продукции RANTES, MCP-1, TNFα, IL-10 и G-CSF.

Проведенные исследования показали (табл. 2), что клетки крови у больных ЦП сохраняют свою функциональную реактивность и, так же как клетки здоровых доноров, способны активно секретировать большинство (20/26) из анализируемых нами цитокинов в ответ на стимуляцию эндотоксином через TLR-4. Как в норме, так и при

**ТАБЛИЦА 2. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ЦП В ОТВЕТ НА СТИМУЛЯЦИЮ ЭНДОТОКСИНОМ**

| Группы | Цитокины | Продукция цитокинов (пг/мл/$10^6$ лейкоцитов) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Доноры (n = 10) | | Больные ЦП (n = 20) | |
| | | Спонтанная | ЛПС | Спонтанная | ЛПС |
| Про- и противо-воспалительные цитокины | IL-1β | 38 (8-59) | 431 (285-500)** | 35 (18-66) | 529 (314-1066)** |
| | TNFα | 42 (20-77) | 848 (748-1187)** | 89 (30-125) | 1310 (465-2157)** |
| | IL-1ra | 53 (24-88) | 239 (139-295)** | 82 (45-130) | 424 (210-748)** |
| | IL-10 | 3,9 (3,4-8,1) | 25 (13,7-58)** | 8 (4-12) | 62 (20-177)** |
| Иммуно-регуляторные цитокины (Th1, Th2, Th9, Th17) | IL-2 | 0,5 (0,4-0,7) | 9,2 (5,6-11,1)** | 0,6 (0,5-0,9) | 9,9 (1,3-17,4)** |
| | IFNγ | 204 (189-312) | 483 (322-705)** | 202 (136-361) | 520 (345-769)** |
| | IL-12 | 4,9 (2,2-6,8) | 6,8 (4,6-11,2)* | 3,0 (1,6-6,9) | 9,4 (6-24)** |
| | IL-4 | 9,4 (7,7-10,8) | 15,2 (12,9-21,7)** | 12,3 (10-15,4) | 21,3 (16,4-29,5)** |
| | IL-5 | 0,7 (0,5-0,8) | 1,0 (0,7-2,8) | 1,2 (0,9-1,5) | 1,2 (0,8-1,8) |
| | IL-6 | 493 (103-939) | 2742 (1813-3478)** | 897 (493-1489) | 5966 (2834-9410)** |
| | IL-9 | 7,5 (6,2-11) | 14,4 (11,1-15,5)* | 19 (7,6-44) | 35 (22-50)* |
| | IL-13 | 4,6 (4-5,2) | 5,3 (3,9-7,7) | 5,7 (2,5-8) | 6,5 (3,8-9,4) |
| | IL-15 | 4,6 (2,5-7,6) | 2,4 (0,9-3,1) | 7,5 (4-11,4) | 4,2 (2,1-6,7) |
| | IL-17 | 0,9 (0,5-4,9) | 24 (16,6-31,3)** | 3,1 (1,5-13,6) | 39 (21-52)** |
| Ростовые факторы | G-CSF | 9,6 (7-31) | 123 (48-145)** | 16,7 (7-37) | 185 (83-311)** |
| | IL-7 | 8,1 (1,7-11,5) | 3,4 (1,5-5,0) | 8,0 (1,7-14,1) | 6,4 (2,7-13) |
| | FGF-β | 0,5 (0,3-0,6) | 2,5 (1,5-3,5)** | 0,7 (0,5-1,7) | 3,7 (1,6-5,2)** |
| | PDGF | 133 (85-153) | 464 (309-587)** | 136 (55-210) | 392 (118-582)* |
| | VEGF | 16,3 (1,6-36) | 45,5 (36,5-57,5)* | 7,5 (2,6-27) | 71 (41-88)** |
| CXC- и CC-хемокины | IL-8 | 1940 (956-2193) | 2383 (1922-3416)* | 2175 (1276-3653) | 3955 (2846-5854)* |
| | IP-10 | 94 (49-178) | 576 (292-743)** | 361 (245-970) | 1090 (664-1697)* |
| | MCP-1 | 899 (527-1490) | 211 (148-370)* | 1402 (830-2258) | 331 (221-736)** |
| | MIP-1α | 58 (24-131) | 552 (454-674)** | 135 (73-276) | 783 (547-1017)** |
| | MIP-1β | 431 (190-507) | 755 (497-944)** | 810 (400-1840) | 1611 (1133-2974)* |
| | RANTES | 473 (346-529) | 811 (736-927)** | 658 (430-1046) | 1237 (544-1792)* |
| | Eotaxin | 64 (48-77) | 75 (60-92) | 88 (69-140) | 122 (78-144) |

**Примечание.** Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ – UQ). * – $p_U < 0,05$ и ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия показателей в группах по сравнению со спонтанной продукцией (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

**ТАБЛИЦА 3. ЛПС-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ТЯЖЕСТИ И ЭТИОЛОГИИ ЦП**

| Группы | Цитокины | ЛПС-индуцированная продукция (пг/мл/$10^6$ лейкоцитов) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Доноры (n = 10) | ЦП класс А (n = 13) | ЦП класс В+С (n = 7) | Невирусный ЦП (n = 8) | Вирусный ЦП (n = 12) |
| Про- и противо-воспалительные цитокины | IL-1β | 431 (285-500) | 496 (366-1116) | 589 (263-1017) | 282 (125-816) | 574 (415-1289)* |
| | TNFα | 848 (748-1187) | 1517 (1063-2187) | 806 (250-2007) | 671 (304-1433) | 2067 (1063-3698)*, # |
| | IL-1ra | 239 (139-295) | 571 (261-776)* | 347 (159-551) | 266 (101-519) | 561 (277-794)** |
| | IL-10 | 25 (13,7-58) | 79 (31-191)* | 36,6 (19,4-118) | 34 (10-135) | 81 (34-179)* |
| Иммуно-регуляторные цитокины (Th1, Th2, Th9, Th17) | IL-2 | 9,2 (5,6-11,1) | 11,5 (5,8-19,8) | 8,7 (1,2-13,5) | 6,1 (0,7-12) | 11 (6,8-20) |
| | IFNγ | 483 (322-705) | 464 (334-865) | 589 (356-672) | 387 (233-526) | 645 (441-1302)## |
| | IL-12 | 6,8 (4,6-11,2) | 12,6 (6,8-23,9)* | 7,2 (2,6-37) | 6,9 (4,1-14) | 12 (7-48) |
| | IL-4 | 15,2 (12,9-21,7) | 18 (16,4-27,6) | 27 (19,4-32,4)* | 18,6 (9,6-29) | 24 (17-30)* |
| | IL-5 | 1,0 (0,7-2,8) | 1,0 (0,8-1,7) | 1,2 (1,0-1,9) | 1,3 (0,7-1,7) | 1,1 (0,9-2,0) |
| | IL-6 | 2742 (1813-3478) | 5849 (3428-7596)* | 6083 (2239-9900)* | 3288 (1775-7916) | 6432 (3972–10600)** |
| | IL-9 | 14,4 (11,1-15,5) | 25,8 (20-36,6)** | 43,4 (36,4-88)**, # | 23 (16-37)* | 40 (30-71)**, # |
| | IL-13 | 5,3 (3,9-7,7) | 7,2 (5,5-8,8) | 4,7 (1,4-18,2) | 5,3 (2,9-6,5) | 7,5 (4,5-14) |
| | IL-15 | 2,4 (0,9-3,1) | 3,8 (3,0-6,2)* | 5,2 (1,8-6,8) | 3,5 (2,5-4,9)* | 5,5 (2,1-7)* |
| | IL-17 | 24 (16,6-31,3) | 33 (20,6-50) | 42 (34-54)* | 27 (7,6-41,6) | 43 (33-54)** |
| Ростовые факторы | G-CSF | 123 (48-145) | 155 (79-351) | 191 (87-251) | 138 (41-241) | 187 (130-431)* |
| | IL-7 | 3,4 (1,5-5,0) | 6,7 (3,4-12,6)* | 4,4 (1,4-14,2) | 6,4 (3,4-11,5) | 6,5 (2,3-13) |
| | FGF-β | 2,5 (1,5-3,5) | 4,1 (2,0-5,0) | 3,2 (0,9-6,7) | 1,5 (0,6-3,3) | 5,0 (3,1-7)**, ## |
| | PDGF | 464 (309-587) | 351 (103-584) | 447 (132-547) | 187 (63-529) | 440 (202-598) |
| | VEGF | 45,5 (36,5-57,5) | 54,2 (44,3-78,7) | 71 (37,7-97) | 34 (13-62) | 77 (63-113)*, # |
| CXC- и CC-хемокины | IL-8 | 2383 (1922-3416) | 3575 (2844-5851) | 4117 (3247-14952)* | 2960 (1855-4012) | 5110 (3683-11633)**, # |
| | IP-10 | 576 (292-743) | 972 (703-1846)* | 1176 (626-1549)* | 756 (187-1298) | 1521 (918-2391)**, # |
| | MCP-1 | 211 (148-370) | 293 (234-618) | 354 (208-875) | 323 (231-736) | 331 (220-681) |
| | MIP-1α | 552 (454-674) | 734 (427-950) | 870 (575-1029)* | 473 (333-930) | 859 (731-1061)**, # |
| | MIP-1β | 755 (497-944) | 1252 (1063-2188)* | 3026 (1252-4863)**, # | 1153 (843-1512) | 2517 (1376-4024)**, # |
| | RANTES | 811 (736-927) | 883 (569-1511) | 1666 (518-1970) | 872 (376-1327) | 1544 (599-1944) |
| | Eotaxin | 75 (60-92) | 112 (74-134) | 135 (85-205)* | 101 (57-132) | 130 (83-174)* |

**Примечание.** Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ-UQ). * – $p_U < 0,05$ и ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия показателей больных ЦП по сравнению с донорами; # – $p_U < 0,05$ – достоверность различия ЦП класса В+С по сравнению с классом А и ЦП вирусной этиологии по сравнению с невирусным ЦП (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

**ТАБЛИЦА 4. ДИСПЕРСИОННЫЙ ОДНОФАКТОРНЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ЦП**

| Цитокины | Доноры (n = 10) *vs* ЦП класс А (n = 13) *vs* ЦП класс В+С (n = 7) | | Доноры (n = 10) *vs* невирусный ЦП (n = 8) *vs* вирусный ЦП (n = 12) | |
|---|---|---|---|---|
| | Спонтанная продукция | ЛПС-индуцированная | Спонтанная продукция | ЛПС-индуцированная |
| | Н-критерий | Н-критерий | Н-критерий | Н-критерий |
| IL-1ra | 2,38 | 3,35 | 4,24 | 6,81* |
| IL-10 | 1,73 | 2,44 | 4,66 | 7,89* |
| IL-4 | 4,31 | 4,0 | 6,26* | 4,1 |
| IL-17 | 4,28 | 4,95 | 6,4* | 7,66* |
| IL-9 | 7,26* | 15,29** | 5,22 | 15,30** |
| FGF-β | 8,31* | 1,76 | 10,43** | 11,42* |
| VEGF | 0,36 | 1,59 | 4,57 | 8,35* |
| IL-8 | 2,23 | 4,99 | 1,92 | 10,45** |
| IP-10 | 13,8** | 5,46 | 15,42** | 10,67** |
| MIP-1α | 2,82 | 4,39 | 3,0 | 8,40* |
| MIP-1β | 6,34* | 11,45** | 6,7* | 13,51** |
| Eotaxin | 5,56 | 6,07* | 5,28 | 5,97* |

**Примечание.** Дисперсионный однофакторный анализ проводили с использованием непараметрического Н-критерия Краскела–Уоллиса. * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,01$ – значимость Н-критерия Краскела–Уоллиса.

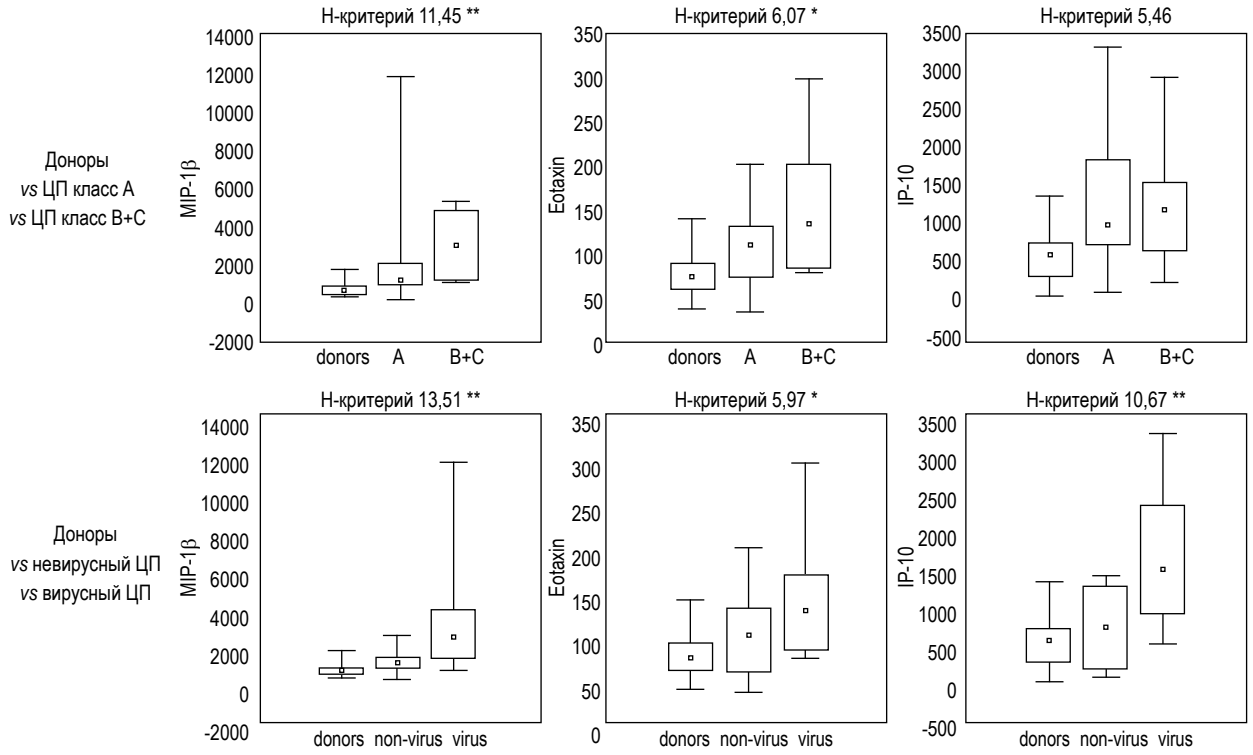


**Рисунок 3. Межгрупповые различия доноров и больных ЦП по уровню ЛПС-индуцированной продукции хемокинов (MIP-1β, Eotaxin, IP-10)**

**Примечание.** Данные получены при проведении дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса и представлены в виде медиан, интерквартильного диапазона, диапазона минимальных и максимальных значений.
* – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,01$ – значимость Н-критерия Краскела–Уоллиса.

ЦП, в условиях митогенной стимуляции значимо не изменялась продукция только 5 цитокинов (IL-13, IL-5, IL-15, IL-7, Eotaxin), а интенсивность синтеза MCP-1 снижалась.

Из данных таблицы 3 видно, что повышенная ЛПС-индуцированная продукция IL-6, IL-9, IP-10, MIP-1β обнаруживалась у больных ЦП независимо от степени тяжести заболевания. Тем не менее, по сравнению с донорами в подгруппе больных ЦП класса А, дополнительно регистрировалось статистически значимое увеличение уровня противовоспалительных цитокинов IL-1ra и IL-10 (очевидно, в ответ на высокий уровень продукции TNFα – 1517 vs 848 пг/мл/$10^6$ лейкоцитов у доноров, $p > 0,05$). Достоверные различия были выявлены и в отношении IL-12, IL-15 и IL-7, хотя, в абсолютных цифрах эти изменения не были столь яркими. Цитокиновый профиль у больных ЦП класса В+С отличался от здоровых доноров прежде всего высоким уровнем ЛПС-индуцированного синтеза хемокинов – не только IP-10 и MIP-1β, но и IL-8, MIP-1α и Eotaxin, а также IL-4. При этом интенсивность секреции IL-9 и MIP-1β была достоверно выше, чем у больных ЦП класса А.

Наименьшие изменения в характере ЛПС-индуцированной продукции цитокинов регистрировались у больных ЦП невирусной этиологии. По сравнению с донорами в данной подгруппе отмечалось лишь незначительное, хотя и статистически достоверное повышение уровня IL-15 и IL-9. В то же время у больных вирусным HCV-гепатитом с исходом в ЦП реактивность клеток крови в ответ на стимуляцию эндотоксином была максимально выраженной. По своим проявлениям регистрируемая в этом случае картина напоминала «цитокиновый шторм» *in vitro*. Клетки больных активно продуцировали про- (IL-1β, TNFα) и противовоспалительные (IL-1ra, IL-10) цитокины, Th1- (IFNγ) и Th2-цитокины (IL-4), IL-6 и IL-17, ростовые факторы (G-CSF, IL-9, FGF-β, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MIP-1β, MIP-1α, Eotaxin). По уровню ЛПС-индуцированной секреции TNFα, IFNγ, IL-9, FGF-β, VEGF, IL-8, IP-10, MIP-1β, MIP-1α больные ЦП вирусной этиологии отличались не только от здоровых доноров, но и от больных ЦП невирусной природы.

Не удивительно, что наибольшее количество (11/12) цитокинов, позволяющих эффективно дискриминировать группы здоровых доноров и больных ЦП с различной этиологией заболевания, обнаруживается в культурах клеток крови, активированных эндотоксином (табл. 4). В отсутствие стимуляции Н-критерий Краскела–Уоллиса был статистически значимым только в отношении 5 медиаторов (IP-10, FGF-β, MIP-1β, IL-17 и IL-4). Следует отметить, что значения Н-критерия IP-10, FGF-β, MIP-1β, IL-9, IL-8 в спонтанных и/или ЛПС-стимулированных культурах клеток крови были сопоставимы со значениями критерия Краскела–Уоллиса таких общепринятых маркеров фиброгенеза, как альбумин (Н-критерий 15,8; $p < 0,01$), общий билирубин (14,02; $p < 0,01$), АЛТ (10,46; $p < 0,01$), АСТ (11,15; $p < 0,01$), ГГТП (9,21; $p < 0,01$), фибриноген (8,42; $p < 0,05$), тимоловая проба (8,0; $p < 0,05$).

Группы здоровых доноров и больных ЦП с различной тяжестью заболевания (класс А и класс В+С по Child-Pugh) различались по уровню спонтанной продукции IP-10, FGF-β, IL-9, MIP-1β, а также ЛПС-индуцированной секреции IL-9, MIP-1β и Eotaxin. В качестве примера на рисунке 3 представлены диаграммы по отдельным хемокинам, секретируемым клетками крови в ответ на стимуляцию эндотоксином, которые позволяют с различной эффективностью различать ЦП как по степени тяжести, так и этиологии заболевания (MIP-1β > Eotaxin), а также специфичны только в отношении этиологии ЦП (IP-10).

## Обсуждение

Цитокины играют важную роль в патогенезе ЦП, детерминируя тяжесть заболевания, развитие печеночных и внепеченочных осложнений [14, 25, 33]. Учитывая плейотропность цитокинов, оценка их патогенетической значимости должна основываться на исследовании широкого спектра цитокинов. Использование мультиплексного протеомного анализа позволяет решить эту задачу и более полно охарактеризовать профиль цитокинов, продуцируемых клетками крови больных ЦП. Клетки периферической крови, включающие нейтрофилы, моноциты и лимфоциты, являются важными медиаторами врожденного и приобретенного иммунитета, однако их роль в поддержании хронического воспаления при ЦП исследована недостаточно. Поэтому при анализе мы использовали оценку 4 функциональных групп цитокинов, вовлеченных в патогенез воспалительного процесса – про-/противовоспалительные цитокины (IL-1β, TNFα, IL-1ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFNγ, IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF-β, PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, Eotoxin).

Проведенное исследование показало, что клетки крови больных ЦП являются активными продуцентами цитокинов и характеризуют-

ся повышенной секрецией цитокинов из всех 4 функциональных групп. Усиление продукции многих цитокинов ассоциировано с тяжестью ЦП и вирусной этиологией ЦП. При этом возрастание как спонтанной, так и ЛПС-стимулированной секреции цитокинов свидетельствует о сохранной реактивности клеток крови к эндотоксину.

В целом по группе достоверное возрастание (из числа цитокинов, концентрация которых превышала 2 пг/мл/$10^6$ лейкоцитов) регистрировалось в нестимулированных культурах крови для 4 цитокинов (IL-4, IL-9, MIP-1β, IP-10) и в ЛПС-стимулированных культурах – для 11 цитокинов (IL-1ra, IL-6, IL-7 IL-15, IL-17, IL-9, IL-8, IP-10, MIP-1α, MIP-1β, Eotaxin). Большинство исследований, сконцентрированных на изучении уровня цитокинов в сыворотке крови, демонстрируют, что пациенты с ЦП характеризуются повышенным уровнем провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-17), а также хемокинов (IL-8, IP-10) [6, 14]. Кроме того, данные о повышенной продукции хемокинов моноцитами у пациентов с ЦП суммированы в обзоре Kochlios [19]. В этом аспекте наши результаты согласуются с данными литературы и позволяют предположить, что клетки крови вносят существенный вклад в изменение сывороточного уровня цитокинов. Кроме того, нами выявлено возрастание ряда иммунорегуляторных и ростовых факторов (IL-7, IL-15, IL-9), которые у больных ЦП ранее не исследовались. IL-15 и IL-7 относятся к цитокинам, поддерживающим гомеостатическую пролиферацию [5] и их возрастание, возможно, связано с лейко- и лимфопенией, являющейся характерным проявлением синдрома гиперспленизма у больных ЦП. IL-9 секретируется Th9-клетками и может участвовать в поддержании воспалительного процесса при аутоиммунных и аллергических заболеваниях [17]. Роль этого цитокина при ЦП не оценивалась, однако последние данные показали значимое увеличение IL-9 в сыворотке крови больных вирусным гепатитом В и прямую корреляцию между концентрацией этого цитокина с уровнем АЛТ, являющегося биохимическим индикатором воспаления при вирусных гепатитах [21].

Сравнение цитокинового профиля у больных с компенсированным (класс А) и декомпенсированным (класс В+С) циррозом показало, что если у пациентов с классом А повышенная спонтанная и стимулированная продукция отмечалась, соответственно, для 2 и 8 цитокинов, то у больных с декомпенсированным ЦП – соответственно, для 7 и 10 цитокинов. Таким образом, утяжеление ЦП проявлялось расширением спектра цитокинов с повышенным уровнем спонтанной продукции за счет хемокинов (IL-8, RANTES, Eotaxin) и иммунорегуляторных цитокинов (IL-9, IL-17). Относительно ЛПС-стимулированной продукции цитокинов, нарастание тяжести ассоциировалось не только с увеличением количества цитокинов с повышенным уровнем продукции, но и с изменением их профиля. Так, несмотря на ряд общих признаков для пациентов с классом А и В+С в виде повышенной секреции IL-6, IL-9 и хемокинов (IP-10 и MIP-1β), характерным для класса А было усиление стимулированной продукции IL-1ra, IL-10 и IL-12, а для пациентов с классом В+С – возрастание иммунорегуляторных цитокинов IL-4, IL-15, IL-17 и хемокинов IL-8, MIP-1α, Eotaxin, а также и более высокая (чем в классе А) продукция IL-9 и MIP-1β. Это позволяет предположить, что на начальных стадиях ЦП клетки крови обладают компенсаторным противовоспалительным потенциалом, который истощается по мере прогрессии ЦП и что декомпенсация ЦП ассоциирована с нарастанием провоспалительной активности клеток крови.

Сопряженность тяжести ЦП с уровнем сывороточных цитокинов (TNFα, IL-8 и IL-6) описана при ЦП как вирусной, так и алкогольной этиологии [10, 14]. В этом плане наши данные являются еще одним аргументом, подтверждающим наличие прямой взаимосвязи между уровнем провоспалительных медиаторов и тяжестью ЦП. Рядом авторов также показана повышенная продукция провоспалительных цитокинов и хемокинов (TNFα, IL-6, MCP-1) моноцитами периферической крови больных ЦП [30]. В то же время нами впервые показано, что профиль цитокинов, продуцируемых в повышенных концентрациях клетками крови, у больных с компенсированным и декомпенсированным ЦП различается. В частности, утяжеление ЦП ассоциировано с усилением продукции клетками крови Th17-, Th9-, Th2-цитокинов и хемокинов (IL-17, IL-9, IL-15, MIP-1β, Eotaxin).

Сравнение цитокинового профиля в зависимости от этиологии ЦП показало, что пациенты с циррозом невирусной этиологии отличались от пациентов с вирусным ЦП значительно меньшим числом цитокинов с повышенным уровнем продукции. Так, усиление спонтанной продукции в этой группе регистрировалось для 2 цитокинов, а стимулированной продукции только для 1 цитокина, тогда как при вирусных ЦП повышенный уровень спонтанной и стимулированной продукции выявлялся, соответственно, для 10 и 17 цитокинов. В литературе нам не встретилось исследований по сравнительной характеристике

цитокинового профиля у пациентов с ЦП различных этиологий. Однако, если при вирусных гепатитах повышенный уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов в сыворотке крови отмечается большинством авторов [2, 6, 9], то данные при алкогольных ЦП менее однозначны. Действительно, некоторые авторы не выявили возрастания сывороточного TNFα, IL-6 и IL-8 при алкогольном ЦП [28] либо отметили возрастание TNFα и IL-8 только при декомпенсированных формах ЦП [10]. Относительно продукции провоспалительных цитокинов показано, что при алкогольных гепатитах секреция TNFα моноцитами крови действительно повышена [23]. В то же время при ЦП моноциты характерзуются сниженной секрецией IL-1 и TNFα [24]. Сходные данные о низкой спонтанной продукции моноцитами IL-1, IL-6, IL-12 и TNFα у пациентов с алкогольным ЦП были получены Laso F.J. с соавт [20]. Поскольку продукция цитокинов клетками крови во многом опосредуется моноцитами, эти данные согласуются с полученными нами результатами. Полученные нами факты позволяют предположить, что при ЦП невирусной этиологии клетки крови в меньшей степени вовлечены в поддержание воспалительного процесса, чем при вирусных ЦП.

Повышенный уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных ЦП, и прежде всего TNFα, связывают с эндотоксемией в результате транслокации бактериальной флоры [4]. Однако, согласно данным литературы, концентрация эндотоксина не коррелирует с уровнем цитокинов. Более того, моноциты периферической крови отвечают продукцией цитокинов на повторную стимуляцию ЛПС [11, 27]. Эти результаты согласуются с полученными нами данными о сохранной реактивности клеток крови на стимуляцию эндотоксином. Отсутствие ЛПС-анергии может быть обусловлено преактивацией отвечающих клеток другими бактериальными антигенами (например, грамм-позитивной флоры) через TLR-2 рецепторы, экспрессия которых повышена при ЦП [27]. Другим объяснением может быть потеря толерантности моноцитами крови в результате повышенной экспрессии TLRs [12].

В целом полученные нами данные свидетельствуют о важном вкладе циркулирующих клеток крови в поддержание воспалительного ответа при ЦП и потенциальной диагностической/прогностической значимости цитокинов, продуцируемых клетками крови.

## Список литературы / References

1. Останин А.А., Черных Е.Р. Сравнительная оценка уровня 17 цитокинов в сыворотке и цельной крови здоровых доноров методом проточной флюориметрии // Цитокины и воспаление, 2005. Т. 4, № 2. С. 25-32. [Ostanin A.A., Chernykh E.R. The comparative analysis of 17 cytokines level in serum and whole blood of healthy donors using the Bio-Plex protein array system. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation, 2005, Vol. 4, no. 2, pp. 25-32.* (In Russ.)]

2. Abd EL-Ghaffar N., Rasheed W.I., Ramzy T., El Batae H. Prognostic significance of interleukins determination in liver diseases. *Res. J. Medicine and Med. Sci., 2008, Vol. 3, no. 2, pp. 124-131.*

3. Akriviadis E., Botla R., Briggs W., Han S., Reynolds T., Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterol., 2000, Vol. 119, no. 6, pp. 1637-1648.*

4. Bellot P., Francés R., Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int., 2013, Vol. 33, no. 1, pp. 31-39.*

5. Boyman O., Létourneau S., Krieg C., Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol., 2009, Vol. 39, no. 8, pp. 2088-2094.*

6. Capone F., Guerriero E., Colonna G., Maio P., Mangia A., Castello G., Costantini S. Cytokinome profile evaluation in patients with hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol., 2014, Vol. 20, no. 28, pp. 9261-9269.*

7. Carson R., Vignali D. Simultaneous quantitation of fifteen cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J. Immunol. Methods., 1999, Vol. 227, no. 1-2, pp. 41-52.*

8. Cervoni J.P., Thévenot T., Weil D., Muel E., Barbot O., Sheppard F., Monnet E., Di Martino V. C-reactive protein predicts short-term mortality in patients with cirrhosis. *J. Hepatol., 2012, Vol. 56, no. 6, pp. 1299-1304.*

9. Costantini S., Capone F., Guerriero E., Maio P., Colonna G., Castello G. Serum cytokine levels as putative prognostic markers in the progression of chronic HCV hepatitis to cirrhosis. *Eur. Cytokine Netw., 2010, Vol. 21, no. 4, pp. 251-256.*

10. Daniluk J., Szuster-Ciesielska A., Drabko J., Kandefer-Szerszeń M. Serum cytokine levels in alcohol-related liver cirrhosis. *Alcohol., 2001, Vol. 23, no. 1, pp. 29-34.*

11. Devière J., Content J., Denys C., Vandenbussche P., Schandene L., Wybran J., Dupont E. Excessive *in vitro* bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology, 1990, Vol. 11, no. 4, pp. 628-634.*

12. Dolganiuc A., Norkina O., Kodys K., Catalano D., Bakis G., Marshall C., Mandrekar P., Szabo G. Viral and host factors induce macrophage activation and loss of toll-like receptor tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology, 2007, Vol. 133, no. 5, pp. 1627-1636.*

13. Fujimoto M., Uemura M., Nakatani Y., Tsujita S., Hoppo K., Tamagawa T., Kitano H., Kikukawa M., Ann T., Ishii Y., Kojima H., Sakurai S., Tanaka R., Namisaki T., Noguchi R., Higashino T., Kikuchi E., Nishimura K., Takaya A., Fukui H. Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcoholism, 2000, Vol. 24, no. 4, pp. S48-S54.*

14. Goral V., Atayan Y., Kaplan A. The relation between pathogenesis of liver cirrhosis, hepatic encephalopathy and serum cytokine levels: what is the role of tumor necrosis factor α? *Hepatogastroenterology, 2011, Vol. 58, no. 107-108, pp. 943-948.*

15. Guarner C., Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 2005, Vol. 17, no. 1, pp. 27-31.*

16. Kamijo A., Yoshizawa K., Joshita S., Yoneda S., Umemura T., Ichijo T., Matsumoto A., Ota M., Tanaka E. Cytokine profiles affecting the pathogenesis of autoimmune hepatitis in Japanese patients. *Hepatol. Res., 2011, Vol. 41, no. 4, pp. 350-357.*

17. Kaplan M.H. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol. Rev., 2013, Vol. 252, no. 1, pp. 104-115.*

18. Kawaratani H., Tsujimoto T., Douhara A., Takaya H., Moriya K., Namisaki T., Noguchi R., Yoshiji H., Fujimoto M., Fukui H. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm., 2013, Vol. 2013, p. 495156.*

19. Kochlios E., Foka P., Mavromara P. Modulation of monocyte/macrophage-derived cytokine and chemokine expression profile by persistent Hepatitis C virus (HCV) infection leads to chronic inflammation. *J. Mol. Biochem., 2012, Vol. 1, no. 1, pp. 40-53*

20. Laso F.J., Vaquero J.M., Almeida J., Marcos M., Orfao A. Production of inflammatory cytokines by peripheral blood monocytes in chronic alcoholism: relationship with ethanol intake and liver disease. *Cytometry part B: Clin Cytom., 2007, Vol. 72, no. 5, pp. 408-415*

21. Li S., Hong-sheng L., Ling-juan R., Zhen-huan R., Xiao-nan K. Expression and clinical significance of T helper 9 cells and interleukin-9 in chronic hepatitis B patients. *Disease Surveillance, 2015, Vol. 30, no. 1, pp. 35-37.*

22. Maher M., Yossef T., Darwesh H., Saady A.E., Sabry A.I., Ahamed W., Safwat A. Estimation role of interleukin 6 as a predictor of hepatic encephalopathy in critically ill cirrhotic patients. *Life Sci. J., 2013, Vol. 10, no. 12s, pp. 987-991.*

23. McClain C.J., Song Z., Barve S., Hill D.B., Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2004, Vol. 287, no. 3, pp. G497-G502.*

24. Muzes G., Deak G., Lang I., Gonzalez-Cabello R., Gergely P., Feher J. Depressed monocyte production of interleukin-1 and tumor necrosis factor-a in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Liver, 1989, Vol. 9, no. 5, pp. 302-306.*

25. Neuman M.G. Cytokines – central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Research Health., 2003, Vol. 27, no. 4, pp. 307-316.*

26. Nieto J.C., Sánchez E., Román E., Vidal S., Oliva L., Guarner-Argente C., Poca M., Torras X., Juárez C., Guarner C., Soriano G. Cytokine production in patients with cirrhosis and TLR4 polymorphisms. *World J. Gastroenterol., 2014, Vol. 20, no. 46, pp. 17516-17524.*

27. Riordan S.M., Skinner N., Nagree A., McCallum H., McIver C.J., Kurtovic J., Hamilton J.A., Bengmark S., Williams R., Visvanathan K. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology, 2003, Vol. 37, no. 5, pp. 1154-1164.*

28. Szuster-Ciesielska A., Daniluk J., Kandefer-Zerszeń M. Serum levels of cytokines in alcoholic liver cirrhosis and pancreatitis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz), 2000, Vol. 48, no. 4, pp. 301-307.*

29. Tang J.T., Fang J.Y., Gu W.Q., Li E.L. T cell immune response is correlated with fibrosis and inflammatory activity in hepatitis B cirrhotics. *World J. Gastroenterol., 2006, Vol. 12, no. 19, pp. 3015-3019.*

30. Tazi K.A., Quioc J.J., Abdel-Razek W., Tellier Z., Guichard C.,Ogier-Denis E., Lebrec D., Moreau R. Protein array technology to investigate cytokine production by monocytes from patients with advanced alcoholic cirrhosis: an *ex vivo* pilot study. *Hepatol. Res., 2009, Vol. 39, pp. 706-715.*

31. Tilg H., Jalan R., Kaser A. Davies N.A., Offner F.A., Hodges S.J., Ludwiczek O., Shawcross D., Zoller H., Alisa A., Mookerjee R.P., Graziadei I., Datz C., Trauner M., Schuppan D., Obrist P., Vogel W., Williams R. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol., 2003, Vol. 38, no. 4, pp. 419-425.*

32. Yagoob P., Newsholme E.A., Calder P.C. Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. *Cytokine, 1999, Vol. 11, no. 8, pp. 600-605.*

33. Zampino R., Marrone A., Restivo L., Guerrera B., Sellitto A., Rinaldi L., Romano C., Adinolfi L.E. Chronic HCV infection and inflammation: clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J. Hepatol., 2013, Vol. 5, no. 10, pp. 528-540.*

**Авторы:**

***Останин А.А.*** *— д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

***Старостина Н.М.*** *— к.м.н., заслуженный врач РФ, заведующая отделением иммунологии клиники иммунопатологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

***Меледина И.В.*** *— к.м.н., врач-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

***Шипунов М.В.*** *— к.м.н., врач-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

***Леплина О.Ю.*** *— д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

***Шевела Е.Я.*** *— д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

***Черных Е.Р.*** *— д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

**Authors:**

***Ostanin A.A.****, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

***Starostina N.M.****, PhD (Medicine), Honored Doctor of the Russian Federation, Head, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

***Meledina I.V.****, PhD (Medicine), Doctor-Immunologist, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

***Shipunov M.V.****, PhD (Medicine), Doctor-Immunologist, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

***Leplina O.Yu.****, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

***Shevela E.Ya.****, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

***Chernykh E.R.****, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

*Поступила 01.07.2015*
*Принята к печати 30.08.2015*

*Received 01.07.2015*
*Accepted 30.08.2015*