Содержание некоторых цитокинов и хемокинов в крови пациентов с хроническим гепатитом В на ранних стадиях фиброза печени

1. *Введение*

Гепатит В – инфекционное вирусное заболевание, при котором происходит повреждение, либо разрушение ткани печени. Риск развития хронического заболевания колеблется от 90% у новорожденных, родившихся от HBeAg-позитивных матерей, до 25-30% у грудных детей и детей в возрасте до 5 лет, и составляет менее 10% у взрослых [4]. Кроме того, вероятность трансформации острого вирусного гепатита В в хронический намного выше у лиц с иммунодефицитными состояниями [3]. В настоящее время, по данным ВОЗ, в мире насчитывается около 257 млн носителей хронического гепатита В (ХГВ) [8]. Течение заболевания – волнообразное, с периодическими обострениями. По мере гибели клетки печени заменяются соединительной тканью, вследствие чего развивается фиброз, а затем цирроз печени. В некоторых случаях возможно развитие гепатоцеллюлярной карциномы [4].

Согласно современным представлениям, повреждение печени при ХГВ зависит от интенсивности воспалительных процессов, уровня виремии и генотипа вируса, при этом ведущую роль играет активность иммунной системы [7]. Участниками воспалительного процесса со стороны врожденного иммунитета являются нейтрофилы, натуральные киллеры и локальные фагоциты. Реакция адаптивного иммунитета на вирусную инфекцию – развитие таких иммунных ответов как цитотоксический, в результате которого появляются специфические цитотоксические клетки, и гуморальный, с формированием антител к различным молекулярным структурам вируса [6].

В регуляции иммунных процессов принимают участие цитокины, специальные пептиды иммунной системы. Отдельную группу цитокинов составляют хемокины – молекулы, регулирующие клеточную миграцию. Выделяют четыре класса хемокинов в зависимости от расположения консервативных цистеинов в белковой молекуле: CXC, CC, CX3C и С, где С обозначает остатки цистеина, а Х – любой другой аминокислотный остаток, разделяющий цистеины. При развитии воспалительных реакций именно они обеспечивают привлечение активированных клеток в очаг воспаления [6]. Основными источниками хемокинов в печени являются активированные моноциты, клетки Купфера, эндотелиальные клетки и гепатоциты [7].

Одной из актуальных задач ведения больных с ХГВ является мониторинг функционального состоянии печени. «Золотым стандартом» диагностики фиброза печени остается пункционная биопсия – инвазивный метод, который не может быть использован для динамического наблюдения. Для оценки фиброза также применяют неинвазивный метод – эластометрию печени, которая позволяет с относительно высокой точностью дифференцировать выраженные и тяжелые степени фиброза, но не обладает достаточной чувствительностью при определении ранних стадий процесса. Цитокины принимают участие в фиброгенезе и потенциально могут служить биомаркерами фиброза печени [5]. С применением современных методов мультиплексного анализа, позволяющего в короткие сроки проанализировать содержание большого спектра биомолекул в плазме крови, возможно точное количественное определение цитокинов и хемокинов, которые могут быть использованы для оценки активности формирования фиброза [2]. Его интенсивность зависит от активности иммунных процессов, сопровождающих заболевание, однако их регуляция с помощью цитокинов имеет высокую внутреннюю сложность за счет многочисленных взаимосвязей разных цитокинов, их рецепторов и клеток-мишеней. По этой причине в настоящее время иммунопатогенез хронического гепатита В не является полностью изученным. Также мало данных о роли различных цитокинов в развитии фиброза при этом заболевании, особенно у пациентов со слабо выраженными клиническими проявлениями.

Целью настоящего исследования стал анализ содержания некоторых цитокинов/хемокинов в периферической крови больных ХГВ для поиска потенциальных биомаркеров начальных стадий фиброза печени.

1. *Материалы и методы*

Настоящее исследование было выполнено в лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. На проведение данного исследования было получено согласие Этического комитета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, протокол №3 от 22.11.2016.

Материалом исследования служила периферическая кровь. Образцы крови забирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K2ЭДТА, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин для отделения плазмы. Плазму отбирали в пробирки типа Эппендорф, замораживали и хранили при t -80o C0.

В исследование было включено 30 пациентов (11 мужчин и 19 женщин) в возрасте 24-69 лет с подтвержденным диагнозом ХГВ, без сопутствующих патологий. Все пациенты проходили лечение в «Клинической инфекционной больнице им. С.П. Боткина», являющейся клинической базой кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета» Минздрава РФ. Диагноз был подтвержден обнаружением в периферической крови пациентов серологических маркеров вируса гепатита В: HBsAg, анти-HBs IgG, анти-HBСor IgG, HBeAg, анти-HBe IgG, наличием вирусной ДНК. Для определения стадии фиброза, пациентам проводилась эластометрия печени. В настоящее исследование были включены пациенты с начальными стадиями фиброза печени (F0-F1 по шкале Metavir) и уровнем вирусной нагрузки менее 7000 копий/мл.

Группу сравнения составили 36 пациентов с диагнозом хронический гепатит С (ХГС), на ранних стадиях фиброза печени (F0-F1), проходивших лечение в этом же учреждении, сопоставимые по полу и возрасту с исследуемой группой. Диагноз был подтвержден обнаружением в периферической крови суммарных антител к вирусу гепатита С (анти-HCV) и выявлением РНК вируса в крови.

Контрольная группа включала 37 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с исследуемой группой, у которых отсутствовали какие-либо клинико-лабораторные и морфологические признаки поражения печени, а также инфекционные и соматические заболевания.

1. *Проведение анализа*

 Концентрации цитокинов/хемокинов: IFNγ, TNFα, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, ССL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3α определяли с помощью мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США), с использованием тест-систем Milliplex MAG Human Cytokine/Chemokine Panel I, II, III (Millipore, США), основанных на магнитных микросферах Milliplex Mag, согласно инструкциям производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGРIX (Luminex, США).

1. *Статистическая обработка*

Статистическую обработку осуществляли с применением программ GraphPad Prizm 6 и Statistica 8. Для построения деревьев решений использовали программу JMP 14. Информативность диагностических показателей определяли методом характеристического (ROC) анализа. Полученные данные не подчинялись нормальному распределению, поэтому для оценки выборок использовали методы непараметрической статистики, в том числе критерий Манна–Уитни, коэффициент корреляции Спирмена. Достоверными считались различия между группами при р < 0,01. Результаты представлены в виде медианы (Ме) и межквартильного размаха (Q25–Q75).

1. *Результаты*

В результате проведенного анализа в периферической крови пациентов с хроническими вирусными гепатитами (ХВГ) и условно здоровых лиц выявлены достоверные различия в содержании цитокинов TNFα, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, ССL2/MCP-1, CCL8/MCP-2 и отсутствие достоверных различий в содержании цитокинов IFNγ, CXCL11/I-TAC и CCL20/MIP-3α. Полученные результаты определения концентраций цитокинов/хемокинов представлены на Рис. 1.

Рисунок 1. Концентрации некоторых цитокинов и хемокинов в периферической крови пациентов с ХГВ и ХГС со стадиями фиброза печени F0-F1 и здоровых доноров (ЗД)

В ходе настоящего исследования было показано, что концентрация TNFα в плазме крови больных ХГВ была повышена в 1,4 раза по сравнению с группой здоровых доноров (9,7 (6,9 – 13,6) пг/мл; 6,8 (5,9 – 8,6) пг/мл; р = 0,0012). Выявлены повышенные концентрации хемокинов: CXCL9/MIG – в 3,3 раза (1433,0 (700,3 – 2643,0) пг/мл; 441,1 (341,9 – 806,9); р<0,0001), CXCL10/IP-10 – в 2,2 раза (405,7 (312,2 – 549,5) пг/мл по сравнению с 183,5 (112,9 – 254,7) пг/мл; р<0,0001), ССL2/MCP-1 – в 1,7 раза (249,5 (183,7 – 402,2) пг/мл; 143,7 (102,7 – 200,4) пг/мл; р<0,0001); сниженное содержание – ССL8/MCP-2, в 1,6 раза (23,6 (17,8 – 37,4) пг/мл; 37,8 (29,9 – 44,3) пг/мл; р=0,0011). Для хемокина CXCL11/I-TAC наблюдается тенденция к повышению: 110,8 (45,7 – 194,8) пг/мл по сравнению с 77,9 (57,7 – 124,2) пг/мл, p=0,4 у здоровых доноров, а для CCL20/MIP-3α - тенденция к снижению: 9,3 (7,7 -17,4) пг/мл по сравнению с 12,9 (9,8 – 15,9) пг/мл, p=0,2 у здоровых доноров. Концентрация IFNγ у пациентов с ХГВ с начальными стадиями фиброза не отличалась от таковой у здоровых доноров (4,8 (3,2 – 8,3) пг/мл; 5,1 (2,9 – 9,7) пг/мл).

Чтобы проанализировать взаимосвязи между исследованными цитокинами и хемокинами, был проведен корреляционный анализ между ними в группе больных ХГВ и в группе условно здоровых лиц. Значимые корреляции представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Корреляционные взаимосвязи измеренных цитокинов и хемокинов в периферической крови у пациентов с хроническим гепатитом В и у здоровых доноров

Для цитокинов периферической крови у обследованной группы пациентов обнаружены корреляции между содержанием TNFα и хемокинов CCL2/MCP-1 и CCL8/MCP-2, чего не наблюдается в контрольной группе. В то же время в контрольной группе обнаружена корреляция между содержанием TNFα и хемокина CXCL9/MIG, что не выявлено в группе больных. Для обеих групп обнаружена корреляция между содержанием хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10.

Таким образом, у больных ХГВ F0-F1 выявлено пять цитокинов/хемокинов, значения которых достоверно отличались от значений контрольной группы. Для того чтобы ответить на вопрос, являются ли эти цитокины специфичными для ХГВ, данные показатели сравнили со значениями у больных ХГС. Выявлено различие в содержании CCL8/MCP-2 в плазме крови с достоверностью p<0,0001 и тенденция к увеличению концентрации CCL2/MCP-1 и CXCL9/MIG в группе пациентов ХГВ по сравнению с ХГС с достоверностью p<0,05. Для оценки возможности разделения пациентов ХГВ и ХГС на ранних стадиях фиброза по уровню хемокинов в плазме крови были построены ROC-кривые, представленные на Рис. 2.

Рисунок 2. ROC-кривые, характеризующие зависимость чувствительности и специфичности исследованных цитокинов и хемокинов при сравнении групп пациентов со стадиями фиброза печени F0-F1, с указанием площади под кривой (AUC, area under ROC curve)

Результаты ROC-анализа показали, что ни один из цитокинов/хемокинов по отдельности не обладает достаточной специфичностью и чувствительностью, а максимальное значение площади под кривой выявляется для хемокина CCL8/MCP-2 и равно 0,79, однако не достигает порогового значения 0,8. Вследствие этого, было принято решение оценить комбинацию цитокинов в качестве биомаркеров, способных охарактеризовать группы пациентов с ХГВ и ХГС на ранних стадиях фиброза. Для этого был применен метод многомерного статистического анализа данных деревьев решений. Полученный алгоритм дифференциальной диагностики причины начальной стадии фиброза печени при хронических вирусных гепатитах представлен на Рис 3.

Рисунок 3. Алгоритм разделения пациентов с ХГВ и ХГС на стадиях фиброза печени F0-F1 по содержанию цитокинов CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2 и IFNγ

В результате анализа были получены следующие пороговые значения для дифференциации причины развития начальной формы фиброза между хроническим гепатитом В и хроническим гепатитом С: CCL2/MCP-1 – 245,3 пг/мл, CCL8/MCP-2 – 21,5 и 28,0 пг/мл, IFNγ – 2,5 пг/мл. Их использование позволяет достигнуть диагностической эффективности в 89,4%, что говорит о хорошем качестве выбранной модели.

1. *Обсуждение*

Обследованная группа больных ХГВ включала пациентов с низкой вирусной нагрузкой и минимальной степенью повреждения печени, однако содержание TNFα в группе больных было повышено по сравнению с группой условно здоровых доноров, что свидетельствует об активации иммунных процессов.

Обнаруженная положительная корреляция TNFα и CCL2/MCP-1 ранее была описана при различных заболеваниях, например при раке простаты или при развитии постменопаузального остеопороза [13, 14]. Наличие у CCL2/MCP-1 двух эффектов – привлечение в очаг воспаления моноцитов и поляризация Т-хелперов от наивных к Т-хелперам второго типа посредством индукции синтеза IL-4 [14] скорее указывает на ведущую роль этого хемокина в первичном распознавании патогена и выборе варианта иммунного ответа. Следовательно, повышение CCL2/MCP-1 является маркером ранней активации иммунной системы, в то время как повышение TNFα – маркер уже сформированного ответа. В патогенезе хронической инфекции эти состояния тесно соседствуют, чем возможно объясняется обнаруженная корреляция.

Известно, что ССL8/MCP-2 является хемотаксическим фактором для моноцитов/макрофагов, Т-хелперов первого типа и натуральных киллеров. В плазме крови обследованной группы пациентов показано его снижение. Кроме других эффектов, он опосредует миграцию этих клеток в область желчных протоков и портальных трактов при воспалении [2]. Можно предположить, что его пониженное содержание у больных ХГВ на ранних стадиях фиброза печени связано с действием иммуносупрессорных механизмов, препятствующих разрушению печени в стадии интеграции. С другой стороны, естественным антагонистом CCR3, одного из рецепторов ССL8/MCP-2, является хемокин CXCL11/I-TAC [11], концентрация которого была повышена у пациентов с ХГВ, что также может обуславливать снижение эффективности данного хемокина. При этом для ССL8/MCP-2 обнаружена положительная корреляция с уровнем TNFα.

Хемокин CCL20/MIP-3α активирует миграцию незрелых дендритных клеток и Т-клеток памяти [9]. Ранее нами была установлена прямая связь между содержанием CCL20/MIP-3α и тяжестью фиброза печени у больных хроническим вирусным гепатитом С [2]. В исследованной группе больных с ХГВ не обнаружено достоверных отклонений уровня этого хемокина, что может быть связано с отсутствием фиброза у этих пациентов.

Хемокины CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/I-TAC являются IFNγ зависимыми [12]. В нашей работе эта взаимосвязь подтверждается выявленной положительной корреляцией их концентраций для группы условно здоровых доноров. Для группы пациентов наблюдается отсутствие корреляционных зависимостей между IFNγ и этими хемокинами. Концентрация IFNγ у пациентов не отличалась от значений контрольной группы, поэтому отсутствие указанных взаимосвязей может свидетельствовать о нарушении иммунных взаимодействий в результате иммуносупрессивного действия вируса и его антигенов.

Группа IFNγ-зависимых хемокинов CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/I-TAC опосредуют миграцию активированных клеток. Выделяемый дендритными клетками CXCL10/IP-10 привлекает T-хелперы первого типа в лимфоузлы, а CXCL9/MIG наоборот - в очаг воспаления. При этом оба хемокина участвуют в привлечении в очаг воспаления активированных эффекторных клеток – цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. У пациентов с ХГВ с фиброзом F0-F1 и низкой вирусной нагрузкой обнаружено отсутствие повышения IFNγ в сочетании с повышенными уровнями CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10. Описанные в литературе свойства этих хемокинов позволяют предположить, что они участвуют в выборе типа иммунного ответа и его тонкой регуляции [10,1]. Повышение содержания хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 в плазме периферической крови указывает на активацию иммунных процессов, тогда как другие признаки воспаления или повреждения печени выражены слабо. Ввиду того, что разрушение печени при ХГВ связано именно с активной деятельностью иммунной системы, эти хемокины могут выступать потенциальными маркерами прогрессирования развития фиброза.

В обследованной группе больных ХГВ не выявлено зависимости концентраций цитокинов и хемокинов в плазме крови от вирусной нагрузки, что может объясняться ее низким уровнем.

Ранее нами было показано увеличение концентраций TNFα, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и ССL2/MCP-1 в плазме крови больных ХГС [2], что также происходит при ХГВ. Сравнение уровней исследованных цитокинов у пациентов с ХГВ и ХГС выявило различие в содержании CCL8/MCP-2, а также тенденцию к увеличению концентрации CCL2/MCP-1 и CXCL9/MIG при ХГВ по сравнению с ХГС. Эти результаты указывают на возможные различия иммунных механизмов сдерживания активности вирусов гепатитов С и В. Несмотря на обнаруженные значимые отличия содержания хемокина CCL8/MCP-2 у пациентов с ХГВ и ХГС, площадь под ROC-кривой для него равна 0,79, что не позволяет достоверно разделить группы больных по этому параметру. Однако использование нескольких цитокинов (IFNγ, ССL2/MCP-1 и CCL8/MCP-2) позволяет построить дерево решений с диагностической эффективностью 89,4%.

1. *Заключение*

В результате проведенного исследования установлено, что у пациентов с диагнозом хронический гепатит В на ранних стадиях фиброза печени при низкой вирусной нагрузке, несмотря на отсутствие или слабое проявление клинических признаков заболевания, в плазме крови обнаружено повышенное содержание цитокина TNFα и хемокинов ССL2/MCP-1, CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 и пониженное – CCL8/MCP-2, что указывает на возможность использования указанных параметров в качестве биомаркеров повреждения печени при хроническом гепатите В.

На основании полученных данных разработан алгоритм, который позволяет дифференцировать в качестве причины развития начальной стадии фиброза печени (F0-F1) хронический гепатит В, либо хронический гепатит С на основании определения уровня цитокинов IFNγ, ССL2/MCP-1 и CCL8/MCP-2 в плазме крови.