

Морозова Т.С.<sup>1</sup>, Гришина И.Ф.<sup>1</sup>, Гурикова И.А.<sup>2</sup>

## Изучение концентрации цитокинов в сыворотке крови больных хроническими гепатитами и циррозами печени, ассоциированными с HBV, HCV-инфекцией

1 – кафедра поликлинической терапии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург; 2 - МБУ «Екатеринбургский консультативно-диагностический центр», г. Екатеринбург

Morozova T.S., Grishina I.F., Gurikova I.A.

### The study of the concentration of cytokines in the blood serum of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis, associated with HBV, HCV-infection

#### Резюме

С целью изучения особенностей цитокинового профиля Т-лимфоцитов периферической крови у больных хроническими вирусными заболеваниями печени было обследовано 73 пациента с хроническими гепатитами и 69 пациентов с циррозами печени вирусной этиологии. Всем больным проведено исследование концентрации цитокинов в сыворотке крови (фактора некроза опухоли  $\alpha$ (ФНО $\alpha$ ), интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерферона- $\gamma$ (ИФН $\gamma$ )). В результате проведенного исследования выявлено достоверное повышение уровня провоспалительных цитокинов и снижение продукции противовоспалительного цитокина. При этом более выраженные изменения цитокинового статуса отмечены у пациентов с циррозами печени, ассоциированными с HBV, HCV-инфекцией.

**Ключевые слова:** хронический гепатит, цирроз печени, цитокины

#### Summary

To study the features of cytokine profile of T-lymphocytes in peripheral blood in patients with chronic viral liver diseases were examined 73 consecutive patients with chronic viral hepatitis and 69 patients with liver cirrhosis of viral etiology. All patients underwent a study of concentration of cytokines in serum (tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )). As a result of the study revealed a significant increase in levels of proinflammatory cytokines and decreased production of anti-inflammatory cytokine. More pronounced changes in cytokine status was observed in patients with liver cirrhosis, associated with HBV, HCV- infection.

**Key words:** chronic hepatitis, liver cirrhosis, cytokines

#### Введение

В последние годы интенсивно изучается состояние сложной, многофакторной и полифункциональной системы цитокинов, регулирующей функциональное состояние клеток, иммунный ответ, механизмы повреждения, воспаления, гемопоэза и неспецифической резистентности [1, 2, 3]. Имунокомпетентные клетки и продуцируемые ими цитокины играют важную роль в прогрессирующем повреждении печени и развитии фиброза при хронических вирусных заболеваниях печени [1, 4, 5, 6]. Противовирусный иммунный ответ сопряжен с активацией CD4+ Т-лимфоцитов и реализуется с участием хелперных клеток первого (Th1) и второго (Th2) типа [3, 7]. Баланс различных функциональных типов Т-клеток и макрофагов во многом определяет эффективность противо-

вирусного ответа [8, 9]. При этом ведущая роль отводится Th1, которые через продукцию интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) активируют цитотоксическую активность CD8+ Т-клеток и макрофагов и усиливают экспрессию HLA антигенов I класса [10, 11, 12]. Доминирование Th2 ответа при хронических вирусных заболеваниях печени ассоциировано со снижением противовирусного ответа и как результат – прогрессированием инфекции и развитием фиброза с последующей трансформацией в цирроз печени [13, 14]. Повышенные уровни провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) установлены при хроническом гепатите (ХГ) вирусной этиологии [12, 15, 16, 17]. Согласно другим данным, у пациентов с HBV и HCV-инфекцией наблюдается повышение сывороточной концентрации интерлейкина-4

(IL-4) и интерлейкина-6 (IL-6) при одновременном снижении уровня интерлейкина-2 (IL-2) [15].

Следует подчеркнуть, что особенности продукции цитокинов и их роль в процессах воспаления и фиброза при хронических вирусных поражениях печени остаются во многом не изученными. Имеющиеся в литературе данные зачастую носят противоречивый характер.

**Цель исследования:** изучить особенности цитокинового профиля Т-лимфоцитов периферической крови у больных хроническими гепатитами и циррозами печени (ЦП), ассоциированными с HBV, HCV-инфекцией.

## Материалы и методы

Всего под наблюдением находилось 142 пациента с хроническими вирусными поражениями печени, из них 70 мужчин и 72 женщины в возрасте от 20 до 55 лет. У 73 человек, в соответствии с существующей классификацией, установлен хронический гепатит В и С, у 69 – цирроз печени вирусной этиологии. У больных хроническим вирусным гепатитом в 19,2% случаев степень активности была минимальной, в 50,7% случаев – умеренной и в 30,1% – высокой. Согласно классификации Child-Pugh распределение больных ЦП по классам тяжести было следующим: класс «А» был установлен в 21 (30,5%) случае, класс «В» – у 33 (47,8%) пациентов и класс «С» – в 15 (21,7%) наблюдениях. Контрольную группу составили 50 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой.

Исследование крови на маркеры вирусных гепатитов В и С проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем «Roche diagnostic systems», ПЦП HCV RNA и HBV DNA – с использованием диагностических наборов фирмы «Литех» (Москва). ANCV IgM определялись методом ИФА тест-системой «Hepatitis C» фирмы «Abbot» (USA).

Для гистоморфологической верификации диагноза всем больным проведена пункционная биопсия печени по методу Mengini, оценка степени активности по R.G. Knodell с использованием полуколичественного метода определения индекса гистологической активности.

Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см<sup>3</sup>). Спонтанную продукцию IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  CD3+ лимфоцитами оценивали по истечении четырех часов инкубации в присутствии брэфельдина А (10  $\mu$ g/ml, «Sigma», Франция) при 37<sup>o</sup>C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. В качестве активатора для стимуляции внутриклеточного синтеза использовали форболмеристат ацетат (50 ng/ml «Sigma», Франция) в комбинации с иономицином (1  $\mu$ g/ml, «Sigma», Франция). Иммунофенотипирование проводили с использованием CD3-FITC моноклональных антител и PE-конъюгированных анти-IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  антител («Caltag», США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ «MedCalc», «Statistika v.6». Отсутствие значимых отличий распределения от нормального, установленное при помощи

теста Колмогорова-Смирнова, позволило использовать t-критерий Стьюдента для определения статистической значимости различий. Результаты представлены как  $M \pm m$ . Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Оценка цитокинового профиля Т-лимфоцитов при ХГ и ЦП вирусной этиологии показала, что относительное и абсолютное содержание Т-лимфоцитов периферической крови, синтезирующих IFN- $\gamma$  и IL-2, как спонтанно, так и в ответ на неспецифическую стимуляцию, достоверно повышено по отношению к показателям в контрольной группе (таблица). В ряде работ установлена повышенная экспрессия интерферона- $\gamma$  и интерлейкина-2 при хронических вирусных гепатитах *in vivo* и *in vitro* [14, 18]. Эта повышенная экспрессия цитокинов Th 1 клона Т-лимфоцитов наблюдается также при циррозе печени и гепатоцеллюлярной карциноме. Согласно полученным данным, содержание Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон- $\gamma$  и интерлейкин-2, статистически значимо выше в группе больных вирусным ЦП по сравнению с группой пациентов с ХГ вирусной этиологии (таблица). Следовательно, Th 1 клетки принимают активное участие в патогенезе повреждения печени при хронической HBV, HCV-инфекции.

Указанные цитокины являются основными индукторами цитотоксической активности различных киллерных клеток. В числе прочих могут активироваться клоны аутореактивных эффекторных клеток. Чрезмерная активация их может привести к аутоиммунным реакциям. С другой стороны, значительное увеличение интерлейкина-2 в конечном итоге может привести к формированию иммунологического ответа супрессорного типа [19]. Интерферон- $\gamma$  и интерлейкин-2 являются ауто- и паракринными регуляторами роста CD4+ Т-лимфоцитов. Одной из важнейших функций этих лимфокинов является поддержка экспансии клеток с цитотоксической активностью [12, 14].

Как острая, так и хроническая вирусная инфекция индуцируют повышение концентрации в крови так называемых провоспалительных цитокинов: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 [12, 15, 16]. Как видно из таблицы, относительное и абсолютное содержание Т-лимфоцитов периферической крови, продуцирующих TNF- $\alpha$ , при хроническом вирусном гепатите и циррозе печени достоверно повышено по отношению к показателям контрольной группы. Следует отметить, что отсутствовала корреляция с параметрами воспалительного процесса (активность АЛТ, АСТ), но прослеживалась взаимосвязь со степенью функциональных нарушений (ПТИ, концентрация сывороточного альбумина).

Таким образом, уровень секреции фактора некроза опухоли  $\alpha$  отражает скорее степень дисфункции печени, чем активность воспалительного процесса. Повышенный уровень TNF- $\alpha$  в системном кровото-

Таблица. Показатели цитокинового профиля Т-лимфоцитов периферической крови у больных хроническим гепатитом и циррозом печени вирусной этиологии

Показатель	Контроль n=50	ХГ n=73	ЦП n=69
CD3 <sup>+</sup> /TNFα <sup>+</sup> спонт., %	4,92 ± 0,52	5,89 ± 0,32*	6,80 ± 0,18*#
CD3 <sup>+</sup> /TNFα <sup>+</sup> спонт., 10 <sup>9</sup> /л	0,09 ± 0,01	0,98 ± 0,09*	1,48 ± 0,08*#
CD3 <sup>+</sup> /TNFα <sup>+</sup> стим., %	43,50 ± 3,26	57,51 ± 2,82*	69,23 ± 3,02*#
CD3 <sup>+</sup> /TNFα <sup>+</sup> стим., 10 <sup>9</sup> /л	0,83 ± 0,08	0,92 ± 0,06*	1,20 ± 0,05*#
CD3 <sup>+</sup> /IFNγ <sup>+</sup> спонт., %	3,01 ± 0,45	4,93 ± 0,64*	5,12 ± 0,77*
CD3 <sup>+</sup> /IFNγ <sup>+</sup> спонт., 10 <sup>9</sup> /л	0,05 ± 0,008	0,08 ± 0,006*	0,09 ± 0,005*#
CD3 <sup>+</sup> /IFNγ <sup>+</sup> стим., %	29,66 ± 2,86	38,16 ± 2,13*	42,17 ± 2,26*#
CD3 <sup>+</sup> /IFNγ <sup>+</sup> стим., 10 <sup>9</sup> /л	0,57 ± 0,06	0,79 ± 0,04*	0,87 ± 0,03*#
CD3 <sup>+</sup> /IL2 <sup>+</sup> спонт., %	2,71 ± 0,38	3,72 ± 0,23*	4,68 ± 0,45*#
CD3 <sup>+</sup> /IL2 <sup>+</sup> спонт., 10 <sup>9</sup> /л	0,05 ± 0,007	0,07 ± 0,006*	0,08 ± 0,005*#
CD3 <sup>+</sup> /IL2 <sup>+</sup> стим., %	23,27 ± 2,06	36,17 ± 2,27*	45,24 ± 2,03*#
CD3 <sup>+</sup> /IL2 <sup>+</sup> стим., 10 <sup>9</sup> /л	0,45 ± 0,05	0,72 ± 0,06*	0,87 ± 0,08*#
CD3 <sup>+</sup> /IL4 <sup>+</sup> спонт., %	3,88 ± 0,43	2,17 ± 0,42*	2,18 ± 0,68*
CD3 <sup>+</sup> /IL4 <sup>+</sup> спонт., 10 <sup>9</sup> /л	0,07 ± 0,009	0,04 ± 0,01*	0,045 ± 0,02*
CD3 <sup>+</sup> /IL4 <sup>+</sup> стим., %	5,35 ± 0,69	2,44 ± 0,66*	2,50 ± 0,63*
CD3 <sup>+</sup> /IL4 <sup>+</sup> стим., 10 <sup>9</sup> /л	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,013*	0,042 ± 0,014*

Примечание: \* - статистически значимые (p<0,05) отличия между показателями при ХГ, ЦП и контрольной группой; # - статистически значимые отличия между группой пациентов с ЦП и группой больных ХГ (p<0,05).

ке при хроническом гепатите и циррозе печени вирусной этиологии приводит к нарушению функционального состояния эндотелиальных клеток сосудов, обуславливая дисфункцию сосудистого эндотелия. Значительное повышение уровня провоспалительных цитокинов у пациентов с хроническими гепатитами и особенно при циррозах печени, ассоциированных с HBV, HCV-инфекцией, обнаружили и другие исследователи [2, 9, 15, 20].

В отличие от провоспалительных, уровень противовоспалительных цитокинов – интерлейкина-4 и интерлейкина-10, меняется при HBV, HCV-инфекции в значительно меньшей степени [5, 13, 14]. Как видно из данных, представленных в таблице, содержание Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-4, как спонтанно, так и в ответ на неспецифическую стимуляцию, достоверно снижено при хроническом вирусном гепатите и циррозе печени по сравнению с показателями контрольной группы. Известно, что IL-4 индуцирует дифференцировку и пролиферацию Т-хелперов второго типа, принимающих участие в основном в гуморальном

иммунном ответе. Кроме того, этот цитокин способен индуцировать экспансию клеток с цитотоксической активностью. Возможно, недостаток именно этого медиатора иммунитета приводит к наблюдаемому при хронических вирусных заболеваниях печени гуморальному иммунодефициту, когда наблюдается резкий недостаток продукции антител к большинству вирусных антигенов [21].

### Заключение

Таким образом, представленные данные указывают на значительную патогенетическую роль иммунных нарушений при хронических гепатитах и циррозах печени, ассоциированных с HBV, HCV-инфекцией. Выявленный дисбаланс в цитокиновой системе с преобладанием провоспалительных ее элементов способствует поддержанию каскада иммунопатологических реакций с развитием воспалительных изменений в печени. Следует отметить, что более выраженные изменения цитокинового профиля сыворотки крови выявлены у больных циррозами печени вирусной этиологии. ■

**Морозова Т.С.**, к.м.н., доцент кафедры поликлинической терапии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург; **Гришина И.Ф.**, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой поликлинической терапии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург; **Гурикова И.А.**, врач-гастроэнтеролог, заведующая отделением саматической патологии МБУ «Екатеринбургский консультативно-диагностический центр»; Автор, ответственный за переписку – Морозова Татьяна Станиславовна, E-mail: t\_moroz2012@mail.ru тел. 8-950-192-42-02.

## Литература:

1. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2008; 18 (4): 4-13.
2. Балмасова И.П., Стаурина Л.Н., Малова Е.С., Сафиуллина Н.Х. Цитокиновый профиль больных хроническими вирусными гепатитами В и С. *Аллергология и иммунология*. 2013; 14 (3): 228.
3. Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Путилова Е.А. и др. Иммунологические показатели при хронических вирусных гепатитах разной этиологии. *Медицинская иммунология*. 2011; 13 (4-5): 408-409.
4. Понезжева Ж.Б., Нагоев Б.С., Дубинина Н.В., Калужин О.В. Клинико-иммунологические особенности хронического гепатита С в зависимости от генотипа вируса. *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2011; 2: 26-30.
5. Szabo G., Mandrekar P., Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin. Liver Dis.* 2007; 27 (4): 339-350.
6. Железникова Г.Ф. Цитокины как предикторы течения и исхода инфекций. *Цитокины и воспаление*. 2009; 1 (8): 10-17.
7. Щёкотов В.В., Булатова И.А., Щёкотова А.П. и др. Влияние противовирусной терапии хронического гепатита С на синтез цитокинов и процессы фиброобразования в печени. *Клиницист*. 2015; 2: 28-35.
8. Собалева О.Л., Михайлова Е.А. Диагностическое значение показателей цитокиновой регуляции в прогнозировании эффективности противовирусной терапии при хроническом микст-гепатите В+С. *Современные технологии в медицине*. 2011; 3: 72-76.
9. Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Горелова И.С. Цитокиновый профиль и фиброзрегулирующая активность ронколейкина при хроническом вирусном гепатите С. *Цитокины и воспаление*. 2014; 13 (1): 44-50.
10. Коненков В.И., Новицкий В.В., Белобородова Э.И. Роль генетически детерминированной продукции иммунорегуляторных цитокинов в иммунопатогенезе хронических вирусных гепатитов. *Бюлл. эксперим. биологии и медицины*. 2007; 6: 648-654.
11. Нагоев Б.С., Понезжева Ж.Б. Оценка иммунной регуляции у больных хроническим гепатитом С. *Инфекционные болезни*. 2009; 7 (3): 8-11.
12. Черных Е.Р., Старостина Н.М., Леплина О.Ю. и др. Цитокиновый профиль у больных хроническими вирусными гепатитами с фиброзом и циррозом печени. *Медицинская иммунология*. 2006; 8 (4): 539-546.
13. Малый В.П., Гололобова О.В. Особенности функционирования иммунной системы при хроническом гепатите С. *Международный медицинский журнал*. 2007; (2): 58-62.
14. Sun Q.L., Ran W. Review of cytokine profiles in patients with hepatitis. *World J. Gastroenterol.* 2004; 15: 1709-1715.
15. Курамышин Д.Х., Толоконская Н.П., Кожевников В.С. и др. Показатели эффекторного звена иммунитета и содержание цитокинов в сыворотке при вирусном гепатите С и сочетанной форме инфекции С+В. *Аллергология и иммунология*. 2000; 1 (2): 107.
16. Шульпекова Ю.О., Маммаев С.Н., Лукина Е.А., Ивашкин В.Т. и др. Характеристика цитокинового профиля сыворотки крови больных хроническим вирусным гепатитом С. *Медицинская иммунология*. 2002; 4 (2): 268.
17. Esteve E., Botas P., Delgado E. Soluble TNF-alpha receptor 2 produced by alternative splicing is paradoxically associated with markers of liver injury. *Clin. Immunol.* 2007; 123 (1): 89-94.
18. Kawakami Y., Nabeshima S., Furusyo N. et al. Increased frequency of interferon-gamma-producing peripheral blood CD4+ T-cells in chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Gastroenterol.* 2000; 95 (1): 227-232.
19. Bergella A.M., Pelligrin P., Del Beato T. et al. The significance of an increase in sIL-2R level in colorectal cancer and its biological regulating role in the physiological switching of the immune response cytokine network from TH1 to TH2 and back. *Cancer. Immunol.* 1998; 45 (5): 241-249.
20. Tacke F., Luedde T., Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2009; 36 (1): 4-12.
21. Chen Y., Sallberg M., Sonnerborg A. et al. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 1999; 116: 135-143.