

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС У БОЛЬНЫХ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ В ИСХОДЕ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

*(НИИ кардиологии и внутренних болезней МЗ РК,
РГП «Центральная лаборатория биоконтроля, сертификации и предклинических испытаний»)*

Статья посвящена исследованию роли Th17- и Treg-лимфоцитов и связанных с ними цитокинов в фиброзе печени в исходе хронического вирусного гепатита С (ХВГС). Цель настоящего исследования: анализ уровней цитокинов различных фенотипов и субпопуляций лимфоцитов у больных с гепатитом С и циррозом печени. Самые высокие показатели цитокинов ИЛ-6, ИЛ-18 и ИЛ-17 наблюдались в группе пациентов с декомпенсированным циррозом печени. Самые низкие показатели у больных с хроническим вирусным гепатитом С. Достоверные различия уровня цитокинов наблюдались между показателями группы пациентов с компенсированным и группы с декомпенсированным циррозом печени. Уровень ИЛ-6 коррелирует с уровнем АЛТ в группе с ХГС, но не в группах с циррозом печени. Проведенные исследования показали, что сигнальные молекулы аутоиммунитета CD4+CD196+ и Th17 играют роль в патогенезе цирроза печени HCV этиологии.

Ключевые слова: цирроз печени, вирусный гепатит С, цитокины, апоптоз лимфоцитов.

В настоящее время более 170 миллионов людей в мире поражены хронической инфекцией вируса гепатита С, которая является причиной хронического гепатита, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. HCV является малым вирусом, который относится к Нерасивирус к семейству Flaviviridae. Принято считать, что с активацией Т-хелперов 1 типа связано не только формирование клеточно-опосредованного иммунного ответа, но и антифибротическая активность. В то же время поляризация Т-хелперных клонов 2 типа приводит к активации ИЛ-4, ИЛ-13 и характеризуется активацией гуморального иммунитета и ассоциируется прогрессированием фиброза.

Клинические проявления хронической HCV-инфекции чрезвычайно вариабельны. Большинство случаев ассоциируется с тяжелым и прогрессирующим заболеванием печени, которое в конце концов может привести к циррозу и гепатоцеллюлярной карциноме. Однако, патогенез повреждения печени во время хронической HCV-инфекции до сих пор остается неясным. Существуют доказательства того, что Т-клеточные иммунорегуляторные цитокины могут играть ключевую роль в персистенции HCV-инфекции и в повреждении печеночной ткани. Th1/Th2 цитокиновый баланс предопределяет хронизацию HCV-инфекции и HCV-индукционное повреждение печени. В 2005 году C.L.Langrish была открыта новая субпопуляция Т-хелперов 17 типа (Th17) [1]. ИЛ-17 также известный как член ИЛ-17А является членом семейства ИЛ-17 цитокинов, которое включает 6 членов: ИЛ-17, ИЛ-17 В, ИЛ17С, ИЛ17D, ИЛ-17Е (также известный как ИЛ-25) и ИЛ-17F. Он секретируется CD4+ Th17 клетками, которые характеризуются также продукцией II-17F (другой представитель семейства ИЛ-17 с замыкающей последовательностью, идентичной ИЛ-17А), ИЛ-6, TNF-б, IL-22 [2]. ИЛ-17 является провоспалительным цитокином, который индуцирует экспрессию ИЛ-1, ИЛ-6, GM-CSF и хемокинов CXCL1, 2 и 8 фибробластов [3]. Th17 экспрессируют CD23R и CCR6 (CD196) рецепторов [4].

Учитывая важную роль в иммунном ответе Т-хелперов 17 типа, представляет интерес роль в цитокиновой сети и в прогрессировании цирроза печени HCV-этиологии Т-хелперов 17 типа и индуцированных ими цитокинов.

Целью настоящего исследования было проведение сравнительного анализа уровней цитокинов различных Т-хелперных фенотипов и субпопуляций лимфоцитов у больных с гепатитом С и циррозом печени.

Материал и методы исследования

В исследование вошли 119 пациентов с диагнозом хронический вирусный гепатит С. (ХВГС). Пациенты были разделены на 3 группы. 1 группу составили 44 пациента с диагнозом «ХВГС», 2 группу составили 30 пациентов с диагнозом «Цирроз печени (ЦП) в исходе вирусного гепатита С, класс А по Чайлд-Туркот-Пью), 3 группу - 45 пациентов с диагнозом «ЦП Класс В и С». В качестве контрольной группы была обследована группа здоровых доноров в количестве 30 человек.

Диагноз ХВГС и ЦП были выставлены согласно критериям современных Руководств EASL (2009), APASL (2010) и Стандартам диагностики и лечения, утвержденными в Республике Казахстан (2009). Всем пациентам были проведены следующие исследования: 1. Клинико-лабораторные: развернутый анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи, коагулограмма. 2. Иммунологические: 1) маркеры вирусных гепатитов, 2) методом проточной флюориметрии исследованы также: количество лимфоцитов, экспрессирующих CD95+(PE), и количество лимфоцитов, экспрессирующих CD4+CD196+ (FITC, Alexa), 3) методом иммуноферментного анализа - концентрации цитокинов сыворотки ИЛ-17, ИЛ-18, ФНОб, ИЛ-6, ИЛ-10, ИНФб, ИЛ1в, ИЛ-2.

Результаты исследования и их обсуждение

Уровни ФНО-б и ИЛ-6 у пациентов достоверно различались от данных показателей в контроле и показатели достоверности составили: для группы больных с ХГВ $P<0,01$ (ФНОб) и $P<0,01$ (ИЛ-6), для группы с ЦП, Класс А: $P<0,01$ (ФНОб) и $P<0,01$ (ИЛ-6), для группы С ЦП Класс В и С $P<0,01$ (ФНОб) и $P<0,01$ (ИЛ-6). Самые высокие показатели цитокинов ИЛ-6, ИЛ-18 и ИЛ-17 наблюдались в группе пациентов с декомпенсированным циррозом печени.

Уровни ИНФг и ИЛ-2 в сыворотке пациентов с хроническим вирусным гепатитом С оказались достоверно выше, чем в контрольной группе ($P<0,01$ $P<0,05$ соответственно). Достоверное

Таблица 1. Результаты исследования цитокинового статуса в зависимости от фенотипа продуцирующего клона Т-лимфоцитов

Пациенты	Контроль	ХГС	ЦП Класс А	ЦП Класс В и С
<i>Th1</i>				
ФНОб	0,5 ± 0,8	124,7 ± 34,8	140,0 ± 81,08	147,08 ± 93,09
ИЛ-2	0,3 ± 0,2	5,6 ± 0,2	1,1 ± 1,9	0,4 ± 2,1
ИНФ-г	1,9 ± 1,3	4,5 ± 4,8	2,9 ± 2,1	1,4 ± 1,2
<i>Th2</i>				
ИЛ-10	0,3 ± 0,5	3,9 ± 1,9	5,7 ± 2,5	5,6 ± 8,9
ИЛ-4	0,2 ± 0,1	4,3 ± 2,7	5,5 ± 3,5	7,7 ± 2,1
<i>Th17</i>				
ИЛ-17	1,27 ± 0,06	14,8 4,7	25,0 ± 6,2	16,5 ± 3,1
ИЛ-18	122,5 ± 6,78	344,8 ± 40,2	351,9 ± 18,5	359,7 63,4
<i>Остальные фенотипы</i>				
ИЛ-6	3,98 ± 1,91	12,65 ± 3,01	89,71 ± 28,1	234,13 ± 56,19

снижение цитокинов ИНФг и ИЛ-2 было обнаружено у пациентов с компенсированным и группы с декомпенсированным циррозом печени в сравнении с группой пациентов с хроническим вирусным гепатитом С.

При персистенции вирусной инфекции специфические CD8+ имеют так называемый «истощенный» фенотип и редко продуцируют ИЛ-2 и ФНО-б, продуцируют небольшое количество ИНФв и экспрессируют высокий уровень PD-1.

Активность CD4+CD25+ регуляторных клеток может лимитировать клиренс хронических вирусных инфекций путем супрессии пролиферации CD8+ и снижения продукции противовирусных цитокинов ИНФг, ФНО-б при ХВГС. Процесс позитивной и негативной селекции лимфоцитов путем апоптоза является основополагающим для

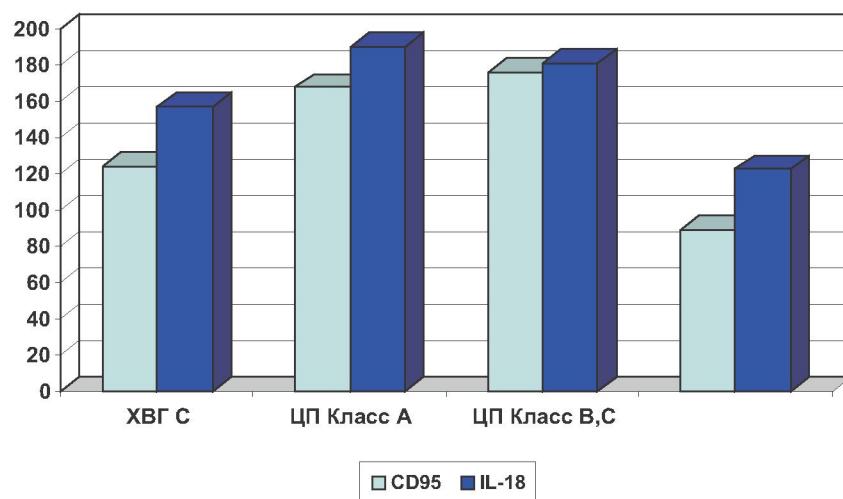
адаптивного иммунного ответа при вирусных инфекциях. Помимо процесса созревания строгой селекции и элиминации через апоптоз подвергаются до 98% лимфоцитов обычно после обязательной «сдачи» серии функциональных тестов. Улучшение через смерть в иммунной системе этим не ограничивается. Программированная клеточная гибель последовательно срабатывает, обеспечивая постоянное лимитированное количество периферических зрелых лимфоцитов (Van Parijs L., Abbas AK., 1998, Strasser A., Pelli-grini M., 2004).

В группах 2 и 3 (18,1 2,9 и 18,1 ± 2,9 /мл, соответственно) в сравнении с группой 1 (17,8 ± 5,4 /мл) достоверного повышения абсолютного количества CD4+CD196 клеток не наблюдалось. Однако во всех опытных группах в сравнении с контрольной

Таблица 2. Результаты исследования субпопуляций лимфоцитов периферической крови у больных с хроническим вирусным гепатитом С и декомпенсированным циррозом печени

Параметры	CD4+ CD196+ Лимфоциты / мл	CD95+ Лимфоциты / мл	CD4+ CD25+ / мл
Группа 1 с ХГС	17,8 ± 5,4 (P<0,05)	123,7 ± 7,4 (P<0,05)	44,1 ± 6,4 (P<0,1)
Группа 2 с циррозом печени Класс А	18,3 ± 1,9 (P>0,05)	159,4 ± 4,2 (P<0,05)	67,3 ± 5,4 (P<0,05)
Группа 3 с циррозом печени Класс В и С	18,1 ± 2,9 (P>0,05)	167,4 ± 9,0 (P<0,05)	73,3 ± 7,1 (P<0,05)
Доноры	9,4 ± 2,4	89,4 ± 4,4	41,3 ± 8,4

Показатели концентрации ИЛ-18 и количества мононуклеаров периферической крови, экспрессирующих маркер апоптоза CD95 у пациентов с диагнозом ХВГ С (1 группа) и цирроз печени в исходе ХГС (2 группа)



группой количество Th17 было достоверно повышенено ($P<0,05$, $P<0,05$ и $P<0,005$ (В соответственно). Концентрация ИЛ-17 у пациентов обеих групп с хроническим вирусным гепатитом С была достоверно выше, чем в группе здоровых доноров ($P<0,05$ (1 группа), $P<0,005$ (2 группа), $P<0,05$ (3 группа) соответственно). Результаты исследования ИЛ-18 и CD95+лимфоцитов у больных показали достоверное повышение данных показателей в обеих опытных группах в сравнении с контрольной, а также достоверное повышение ИЛ-18 и CD95+лимфоцитов во 2 группе в срав-

нении со второй опытной группой. Кроме того, показатели ИЛ-18 и CD95+лимфоцитов показали корреляцию в группе с циррозом печени Класс В и С ($r = 0,42$).

Проведенные исследования показали, что сигнальные молекулы аутоиммунитета ИЛ-17 и Th17 играют роль в патогенезе хронического вирусного гепатита С, однако в прогрессировании клинических проявлений играют роль ИЛ-6, ИЛ-18 и Т-регуляторные.

Уровень ИЛ-6 коррелирует с уровнем АЛТ в группе с ХГС, но не в группах с циррозом печени.

Таблица 3. Оценка коэффициента корреляции между некоторыми показателями в группе больных с хроническим вирусным гепатитом С

Параметры	ИЛ-6	ИЛ-10	ИЛ-18
Длительность заболевания	0,65 ($P<0,01$)	0,83 ($P<0,001$)	–
АЛТ	0,61 ($P<0,01$)		0,63 ($P<0,01$)
АСТ	–		0,57 ($P<0,01$)

Заключение. Для хронического гепатита С также характерна активация цитокинов Th1, Th2 и Th17. Активация цитокинов и поляризация Т-хелперов в Th1, Th2, Th17 или Treg имеют значение не только для формирования иммунного ответа, но и для запуска фиброза печени. Формирование цирроза печени в исходе вирусного гепатита С характеризуется повышением продукции цитокинов Т-хелпер-2 клона и Т-хелпер17 клона. Декомпенсированный цирроз печени в исходе вирусного гепатита С характеризуется усугублением Th1-иммунодефицитного состояния при сохраняющейся активности провоспалительных цитокинов ФНОб и ИЛ-18.

ИЛ-6 и ИЛ-10 показал корреляцию с длительностью хронического гепатита С. ИЛ-18 играет негативную роль в иммунопатогенезе цирроза печени HCV и HBV этиологии. Процесс негативной и позитивной селекции лимфоцитов путем апоптоза является важным в функциональной активности иммунокомпетентных клеток при формировании цирроза и зависит от активности ИЛ-18. Учитывая антагонизм между провоспалительными цитокинами ИЛ-18, ФНОб и ИЛ-10, как противовоспалительного цитокина, роль ИЛ-10, снижающего внутрипеченочное воспаление, вероятно, является одной из самых важных в защите от фиброза печени вирусной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Langrish C.L., e.a. IL-23 drives a pathogenic T-cell population that induces autoimmune inflammation // *J. Exp. Med.* 2005. 201. P. 233-240.
2. Aggarwal S. Et Gurney A.L. IL-17 prototype member of an emerging cytokines family // *J. Leukoc. Biol.* 2002. 71. P. 1-8.
3. Rapamycin selectively expands CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells Manuela Battaglia, Angela Stabilini, and Maria-Grazia Roncarolo // *Blood*. 15 June 2005. V. 105, N 12. P. 4743-4748. Prepublished online as a Blood First Edition Paper on March 3, 2005. DOI 10.1182 / blood-2004-10-3932.
4. Schmidt-Weber CB. Th17 and treg cells innovate the TH1/TH2 concept and allergy research // *Chem Immunol Allergy*. 2008. 94. P. 1-7.
5. Francesco Annunziato., e.a. The phenotype of human T_h17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of T_h17 cells in inflammation// *International Immunology*. 2008. V. 20. Issue 11. P. 1361-1368.
6. Ивашкин В.Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2009. Т. 19, № 2. С. 8-13.
7. Frei K., e.a. Tumor necrosis factor alpha are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis // *J. Exp. Med.* 185. P. 2177-2182.
8. Lee M.H., Hong I., Kim M., Lee B.H., Kim J.H., Kang K.S., Kim H.L., Yoon B.I., Chung H., Kong G., Lee M.O. Gene expression profiles of murine fatty liver induced by the administration of valproic acid // *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007. Apr. 1. 220(1). P. 45-59.
9. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells // *Nature*. 2006. May 11. 441(7090). P. 235-8.

Резюме

Th17- және Treg-лимфоциттер рөлі мен онымен байланысқан созылмалы С вирусты гепатиті (ССВГ) ақырындағы бауыр фиброзында цитокиндердің зерттелген. Зерттеудің мақсаты: Бауыр циррозы және В гепатиті бар науқастарда лимфоциттер субпопуляциясы мен әртүрлі фенотиптер цитокиндер деңгейін сараптамалау. ИЛ-6, ИЛ-18 и ИЛ-17 цитокиндерінің ең жоғары көрсеткіштері бауыр циррозы бар декомпенсиленген науқастар тобында байқалды. Ал олардың ең темен көрсеткіштері созылмалы С гепатиті бар науқастарда байқалды. Цитокиндер деңгейінің дөлелді ерекшеліктері бауыр циррозы бар компенсиленген науқастар тобы мен декомпенсиленген науқастар тобы көрсеткіштері арасында байқалды. ИЛ-6 деңгейі ССГ тобындағы АЛТ деңгейімен өзара байланысады, бірақ бауыр циррозы бар топтарда емес. Жүргізілген зерттеулер HCV этиологиялы бауыр циррозы патогенезінде CD4⁺CD196⁺ и Th17 аутоиммунитеттің дабылды молекулалары рөл аткаратының көрсетті.

Summary

This paper describes the research of role of Th17- and Treg-lymphocytes and associated with them cytokines in liver fibrosis caused by chronic hepatitis C (CHC). The aim of this study was to research the cytokines levels of different phenotypes an subpopulation of lymphocytes in patients with the CHC (N=44), with the liver cirrhosis (LC) caused by CHC Class A (Child-Pugh) N=30, and with the LC Class B and C N=45. The most high rates of cytokines IL6, IL18 and IL17 have shown the patients with advanced cirrhosis (Class B and C). The levels of cytokines in the group with advanced cirrhosis were significant higher than in the patients with the CHC and with the cirrhosis Class A. The level of IL6 has correlated with the concentration of ALT in the CHC patients but non in LC patients. These results indicate that the autoimmune signal molecules CD4⁺CD196⁺ and IL-17 participate in the pathogenesis of progression HCV chronic liver disease.