

Особенности клеточного иммунитета и регенерации при алкогольном фиброзе печени

Газатова Н.Д.¹, Юрова К.А.¹, Гаврилов Д.В.², Вульф М.А.¹,
Новицкий В.В.³, Тодосенко Н.М.¹, Литвинова Л.С.¹

¹ Балтийский федеральный университет (БФУ) им. И. Канта
Россия, 236029, г. Калининград, ул. Гайдара, 6

² Наркологический диспансер Калининградской области
Россия, 236006, г. Калининград, ул. Барнаульская, 6а

³ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени (АФП).

Материалы и методы. В исследование были включены 62 больных АФП; 15 пациентов, злоупотребляющих алкоголем, без фиброза печени и 20 условно здоровых доноров. В образцах лизированной периферической крови методом проточной цитометрии определяли число клеток, несущих поверхностные маркеры.

Результаты. У больных АФП на терминальных стадиях (ст.) фиброза регистрировалась значительная лимфопения с изменением состава основных субпопуляций лимфоцитов относительно значений условно здоровых доноров и группы сравнения. Выявленное нами в крови больных АФП с терминальными (III–IV) ст. заболевания снижение (относительно контроля и группы сравнения) относительного числа наивных (T_N) и Т-лимфоцитов центральной памяти (T_{CM}), ассоциированное с ростом количества эффекторных клеток (T_{EM} и T_{EMRA}), позволяет нам предположить у этой категории больных факт прямой дифференцировки лимфоцитов T_N и T_{CM} в эффекторные (T_{EM} и T_{EMRA}), что может усугублять течение тканедеструктивного процесса за счет высокой биоцидной активности последних. Повышенный уровень гемопоэтических (CD34 и CD133) клеток в периферической крови на начальных и умеренных (I–II) ст. фиброза (относительно контроля и группы сравнения) может быть обусловлен персистирующим воспалением в паренхиме печени и нарастающим дисбалансом между процессами ее повреждения и репаративными возможностями. Тогда как снижение их количества на терминальных ст. фиброза может свидетельствовать о нарастающей декомпенсации и истощении регенераторного потенциала организма на финальных этапах дегенеративного процесса.

Заключение. В целом полученные данные демонстрируют новые аспекты иммунной регуляции процессов фиброгенеза при хроническом алкоголизме.

Ключевые слова: хронический алкоголизм, цирроз печени, алкоголь, субпопуляционный состав лимфоцитов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках субсидии, выделенной на реализацию Программы повышения конкурентоспособности и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ им. И. Канта.

✉ Литвинова Лариса Сергеевна, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом БФУ им. И. Канта (протокол № 25 от 26.12.2017).

Для цитирования: Газатова Н.Д., Юрова К.А., Гаврилов Д.В., Вульф М.А., Новицкий В.В., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Особенности клеточного иммунитета и регенерации при алкогольном фиброзе печени. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 175–189. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-175-189>.

УДК 616.36-004.4-092.19:577.27

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-175-189>

Features of cellular immunity and regeneration for alcoholic fibrosis of the liver

Gazatova N.D.¹, Yurova K.A.¹, Gavrillov D.V.², Vulf M.A.¹, Novitskiy V.V.³, Todosenko N.M.¹, Litvinova L.S.¹

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University (IKFU)
6, Gaidar Str., 236029, Kaliningrad, Russian Federation

² Drug Dispensary Kaliningrad Region (DDKG)
6a, Barnaulskaya Str., 236006, Kaliningrad, Russian Federation

³ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Trakt, 634050, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

Purpose. The subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes was evaluated in patients with alcoholic liver fibrosis (ALF).

Materials and methods. The study included 62 patients with ALF; 15 patients abusing alcohol without liver fibrosis and 20 conditionally healthy donors. In samples of lysed peripheral blood, the number of cells bearing surface markers was determined by flow cytometry. In patients with ALF at terminal stages of fibrosis, significant lymphopenia was recorded with a change in the composition of the main subpopulations of lymphocytes relative to the values of conditionally healthy donors and the comparison group.

Results. We identified in the blood of ALF patients with terminal (III–IV) stage (relative to control and comparison group) of the relative number of naive (T_N) and central memory T-lymphocytes (T_{CM}) associated with an increase in the number of effector cells (T_{EM} and T_{EMRA}) allows us to suggest in this category of patients the direct differentiation of T_N and T_{CM} lymphocytes to effector (T_{EM} and T_{EMRA}), which can aggravate the course of the tissue-destructive process due to the high biocidal activity of the latter. Elevated levels of hematopoietic (CD34 and CD133) cells in the peripheral blood at the initial and moderate stages. (I–II) fibrosis (relative to control and comparison group) may be due to persistent inflammation in the liver parenchyma and an increasing imbalance between the processes of its damage and reparative capabilities. Whereas the decrease in their number at the terminal station fibrosis may indicate an increasing decompensation and depletion of the regenerative potential of the organism in the final stages of the degenerative process.

Conclusions. In general, the obtained data demonstrate new aspects of the immune regulation of the processes of fibrogenesis in chronic alcoholism.

Key words: alcoholic liver fibrosis, chronic alcoholism, liver cirrhosis, cellular immunity, alcohol, subpopulation composition of lymphocytes.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out due to the aim grant allocated for the implementation of the Competitiveness Enhancement Program and the grant “Organization of scientific research 20.4986.2017 / BY” of Immanuel Kant Baltic Federal University.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee under IKFU (Protocol No. 25 of 26.12.2017).

For citation: Gazatova N.D., Yurova K.A., Gavrilov D.V., Vulf M.A., Novitskiy V.V., Todosenko N.M., Litvinova L.S. Features of cellular immunity and regeneration for alcoholic fibrosis of the liver. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 175–189. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-175-189>.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема хронических диффузных заболеваний печени, включая стеатоз, фиброз и цирроз, относится к приоритетам национальных систем здравоохранения индустриально развитых стран мира [1, 2]. Преобладающим этиологическим фактором в патогенезе хронических заболеваний печени является длительное употребление алкоголя [2, 3]. Цикличность процессов повреждения и репарации гепатоцитов при фиброгенезе, индуцированного большинством гепатотоксических факторов, ассоциируют с дисрегуляцией дистантных и локальных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета [4].

Согласно современным представлениям, печень в условиях физиологической нормы рассматривается в качестве иммунного органа, обогащенного клетками врожденного (клетки Купфера, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, натуральные киллеры (NK, natural killer), Т-клетки натуральные киллеры (NKT, включая инвариантные iNKT-клетки) и др.) и адаптивного (популяции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, В-лимфоциты) иммунитета. Характеризуется сложной и активной цитокиновой средой, включающей экспрессию основных провоспалительных (интерлейкина (IL) 2, IL-7, IL-12, IL-15, интерферона (IFN) γ и др.) и противовоспалительных (IL-10, IL-13 и трансформирующего фактора роста (TGF) β) медиаторов резидентными клетками [4]. В то же время для предотвращения чрезмерной активации печень поддерживает статус иммунной толерантности [4].

Хроническое злоупотребление алкоголем модулирует морфофункциональное состояние всех популяций иммунных клеток [4]. В частности, этанол опосредует гиперактивацию клеток врожденного иммунитета как в периферической крови, так и в тканях печени за счет бактериальных токсинов, проникающих в избыточных количествах в системную циркуляцию, вследствие повышенной проницаемости кишечной стенки и сниженной функции печени [3]. Высокий уровень

продукции этими клетками активных форм кислорода и целого спектра молекул с провоспалительным действием стимулирует трансформацию резидентных звездчатых клеток печени (ЗКП, клетки Ито) в миофибробласты, продуцирующие компоненты внеклеточного матрикса с последующим их накоплением в пространстве Дриссе, а также способствует миграции иммунных клеток из кровотока в очаг повреждения, приводя к усилению инфильтративного компонента воспаления, усугубляя, тем самым, повреждение паренхимы печени [5]. В то же время длительный прием алкоголя способствует развитию лимфопении, с увеличением числа активированных Т-клеток в циркуляции, опосредованной их гомеостатической пролиферацией [5, 6].

Учитывая тот факт, что механизмы этанолиндуцированного фиброгенеза до конца не расшифрованы, интерес к оценке состояния клеточного звена врожденного и адаптивного иммунитета у больных алкогольной болезнью печени (АБП) продиктован участием иммунных клеток в регуляции воспалительных и регенеративных реакций, возникающих в ответ на повреждение гепатоцитов, и, в конечном итоге, их ролью в модуляции печеночного фиброгенеза. В настоящей работе была проведена оценка параметров клеточного иммунитета и регенерации у пациентов с алкогольным фиброзом печени, ранжированных по стадиям (ст.) процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая из локтевой вены утром натощак с помощью стандартных вакуумных систем BD VACUTAINER™ (Greiner-bio-one, Австрия) с гепарином (20 Ед/мл) у 62 больных алкогольным фиброзом печени (АФП, МКБ 10 – K70.2; 32 женщины и 30 мужчин в возрасте $(46,4 \pm 5,6)$ лет), 15 пациентов, злоупотребляющих алкоголем без нарушенной функции печени (8 женщин и 7 мужчин в возрасте $(42,1 \pm 4,2)$ лет) и 20 условно здоровых доноров (10 женщин и 10 мужчин

в возрасте ($38,3 \pm 6,4$) лет). Пациенты с АФП были ранжированы на четыре группы в зависимости от ст. фибротического процесса (по шкале

METAVIR, I ст. – 17 человек, II ст. – 16 человек, III ст. – 17 человек, IV (цирроз) ст. – 12 человек) (табл. 1).

Т а б л и ц а 1
T a b l e 1

Распределение больных алкогольным фиброзом печени (АФП) по стадиям Distribution of patients with alcoholic liver fibrosis (ALF) by stages						
Показатель Characteristic	Стадия Stage				Условно здоровые доноры Conditionally healthy donors	Без АФП Without ALF
	I	II	III	IV		
Стадия фиброза по METAVIR Stage of fibrosis according to METAVIR						
Количество пациентов, <i>n</i> Number of patients, <i>n</i>	17	16	17	12	20	15
Возраст, лет Age (years)	$43,5 \pm 3,28$	$46,92 \pm 5,39$	$44,39 \pm 5,33$	$42,91 \pm 6,03$	$38,3 \pm 6,4$	$42,1 \pm 4,2$
Мужчины/женщины Male/Female	8/9	8/8	9/8	6/6	10/10	7/8

Пациенты с АФП и без нарушений структуры и функций печени, вошедшие в исследование, имели в анамнезе хроническое злоупотребление алкоголем и характеризовались как сильно пьющие (4 200–5 600 г 100%-го этанола в месяц), со стажем употребления алкоголя не менее 3 и не более 10 лет. Для исключения прямого действия этанола на исследуемые параметры взятие крови производили на 7-е сут после детоксикационной терапии в условиях стационара.

Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялись заведующим наркологическим отделением, врачом психиатром-наркологом Д.В. Гавриловым на базе ГБУЗ «Наркологический диспансер Калининградской области» (гл. врач – Ю.Н. Скалин), а также заведующим диагностическим отделением, врачом ультразвуковой диагностики высшей квалификационной категории Н.Б. Котовым на базе клинко-диагностического центра ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта» (гл. врач – О.В. Иванова). Диагностические исследования включали опрос пациентов, полигепатографию, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, фиброэластометрию печеночной паренхимы, биохимический анализ крови.

Подготовка проб для проведения иммунофенотипического анализа в образцах цельной венозной крови была осуществлена по методике «Окрашивание – лизис». Образцы цельной венозной крови в объеме 10 мкл были инкубированы при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 мин с 10 мкл различных коктейлей моноклональных антител, приготовленных *ex tempore*, в иммунологических планшетах. Далее для лизирования эритроцитов в образцах использовали реагент Guava 1X Lysing Solution

(Merck Millipore, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

В образцах лизированной периферической крови число клеток, несущих поверхностные маркеры (CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD62L, CD45R0, CD34, CD133), определяли методом проточной лазерной цитометрии с помощью коктейля моноклональных антител, конъюгированных с Viablue (CD45); аллофиикоцианином (APC) (CD19, CD62L); флуоресцинизиотонатом (FITC) (CD4, CD34, CD16, CD45R0), фикоэритрином (PE) (CD8, CD56, CD133); с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7) (CD3), согласно протоколам производителей (Miltenyi Biotec, Германия; Abcam, Cambridge, Великобритания; e-Bioscience, США). Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлуориметре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия).

Коктейли использованных моноклональных антител: CD45-Viablue, CD3-PE.Cy7, CD4-FITC, CD8-PE; CD45-Viablue, CD3-PE.Cy7, CD16-FITC, CD56-PE, CD19-APC, CD45-Viablue, CD3-PE.Cy7, CD45RO-FITC, CD62L-APC; CD45-Viablue, CD34-FITC, CD133-PE. Все результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез [7]. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения Колмогорова – Смирнова. Для нормально распределенных выборок вычисляли средние выбо-

рочные характеристики: среднее арифметическое \bar{X} , ошибку среднего m ; для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану, первый и третий квартили $Me (Q_1-Q_3)$. Для оценки достоверности различий выборок использовали параметрический t -критерий Стьюдента или непараметрический Манна – Уитни для независимых выборок. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена r) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии r^2) анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [7]. При проведении сравнительного анализа изучаемых показателей клеточного иммунитета и регенерации в группе условно здоровых доноров, у лиц с хроническим злоупотреблением алкоголя с и без фиброза печени в зависимости от гендерных критериев достоверных различий тестируемых параметров не выявлено. Ввиду отсутствия значимых различий между исследуемыми показателями клеточного иммунитета и регенерации у больных АФП с I и II ст. фиброза они были объединены в одну группу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Употребление этанола, даже умеренное, изменяет врожденные и адаптивные иммунные реакции, выявляя специфические нарушения в зависимости от длительности и интенсивности приема (острое, хроническое) и наличия или отсутствия АБП [8]. Провоспалительные реакции, развивающиеся вследствие длительного приема алкоголя, играют важную роль в патогенезе АБП [9]. В целом эффекты алкоголя на иммунитет, особенно при его хроническом употреблении, опосредуют развитие субклинической иммуносупрессии, которая становится клинически значимой только после вторичной компроментации (бактериальная, вирусная инфекции, декомпенсационная фаза повреждения ткани и т.д.) [10].

У обследованных нами больных АФП с III ст., злоупотребляющих алкоголем, регистрировалось значимое снижение относительного, а у больных циррозом (IV ст.) печени абсолютного и относительного числа лимфоцитов содержания $CD45^+CD3^+$ и $CD45^+CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови в сравнении с контролем и группой хронических алкоголиков без АБП (табл. 2).

Т а б л и ц а 2
T a b l e 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у больных алкогольным фиброзом (АФП) печени, ранжированных по стадиям
Subpopulation of peripheral blood lymphocytes in patients with alcoholic liver fibrosis (ALF) ranked by stages

Показатель Characteristic	Обследованные Examined				
	Здоровые доноры $n = 20$ Healthy donors $n = 20$	Без АФП $n = 15$ Without ALF $n = 15$	I–II ст. $n = 33$ I–II stages $n = 33$	III ст. $n = 17$ III stage $n = 17$	IV ст. $n = 12$ IV stage $n = 12$
	I	II	III	IV	V
Общее количество лейкоцитов, 10%/л, $\bar{X} \pm m$ Total leucocyte count, 10%/l, $\bar{X} \pm m$	5,79 ± 0,78	5,83 ± 0,67	5,96 ± 0,35	6,29 ± 1,16	6,55 ± 1,85
$CD45^+$, 10%/л, $CD45^+$, 10%/l	2,81 ± 0,13	2,69 ± 0,24	2,74 ± 0,15	2,69 ± 0,31	1,55 ± 0,53 $p_0 = 0,011$ $p_1 = 0,016$ $p_2 = 0,029$ $p_3 = 0,041$
$CD45^+$, %, $Me (Q_1-Q_3)$	36,63 (34,59–38,91)	34,22 (33,20–37,54)	36,43 (35,11–37,92)	30,91 (29,10–34,32) $p_0 = 0,015$ $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,034$	26,11 (25,49–27,91) $p_0 = 0,045$ $p_1 = 0,024$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,047$
$CD45^+CD3^+$, 10%/л, $\bar{X} \pm m$ $CD45^+CD3^+$, 10%/l, $\bar{X} \pm m$	1,85 ± 0,41	1,76 ± 0,32	1,85 ± 0,61	1,78 ± 0,24	1,24 ± 0,31 $p_0 = 0,028$ $p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,039$ $p_3 = 0,021$

Продолжение табл. 2
End of table 2

Показатель Characteristic	Обследованные Examined				
	Здоровые доноры <i>n</i> = 20 Healthy donors <i>n</i> = 20	Без АФП <i>n</i> = 15 Without ALF <i>n</i> = 15	I–II ст. <i>n</i> = 33 I–II stages <i>n</i> = 33	III ст. <i>n</i> = 17 III stage <i>n</i> = 17	IV ст. <i>n</i> = 12 IV stage <i>n</i> = 12
	I	II	III	IV	V
CD45 ⁺ CD3 ⁺ , %, <i>Me</i> (Q_1-Q_3)	77,43 (72,56–78,87)	74,12 (70,21–76,38)	75,08 (72,34–77,34)	63,01 (62,12–66,37) $p_0 = 0,026$ $p_1 = 0,038$ $p_2 = 0,024$	61,92 (59,17–62,96) $p_0 = 0,034$ $p_1 = 0,019$ $p_2 = 0,042$ $p_3 = 0,038$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$ CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$	0,94 \pm 0,14	0,83 \pm 0,11	0,87 \pm 0,12	0,88 \pm 0,09	0,58 \pm 0,02 $p_0 = 0,045$ $p_1 = 0,034$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,048$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %, <i>Me</i> (Q_1-Q_3)	48,62 (43,11–48,98)	45,38 (42,98–47,38)	46,81 (46,20–49,01)	43,09 (36,29–44,29) $p_0 = 0,032$ $p_1 = 0,016$ $p_2 = 0,045$	38,72 (32,39–39,24) $p_0 = 0,020$ $p_1 = 0,017$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,023$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10% λ , <i>Me</i> (Q_1-Q_3) CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10% λ , <i>Me</i> (Q_1-Q_3)	0,78 (0,76–0,83)	0,75 (0,73–0,79)	0,82 (0,79–0,84)	0,65 (0,63–0,68) $p_0 = 0,039$ $p_1 = 0,041$ $p_2 = 0,046$	0,54 (0,51–0,56) $p_0 = 0,045$ $p_1 = 0,027$ $p_2 = 0,034$ $p_3 = 0,048$
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %, <i>Me</i> (Q_1-Q_3)	29,91 (26,49–31,12)	30,01 (29,19–32,10)	32,35 (31,93–36,29) $p_0 = 0,021$ $p_1 = 0,044$	21,39 (20,32–23,49) $p_0 = 0,028$ $p_1 = 0,030$ $p_2 = 0,017$	20,42 (18,39–24,21) $p_0 = 0,032$ $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,042$
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$ CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$	0,43 \pm 0,04	0,41 \pm 0,8	0,44 \pm 0,03	0,41 \pm 0,11	0,34 \pm 0,05 $p_0 = 0,019$ $p_1 = 0,026$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,023$
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺ , %, <i>Me</i> (Q_1-Q_3)	15,72 (14,39–16,01)	14,73 (14,55–15,78)	16,02 (15,98–16,91)	12,43 (9,92–13,01)	11,09 (7,21–11,98) $p_0 = 0,034$ $p_1 = 0,045$ $p_2 = 0,037$
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$ CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10% λ , $X \pm m$	0,24 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	0,23 \pm 0,05	0,24 \pm 0,06	0,21 \pm 0,08
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %, <i>Me</i> (Q_1-Q_3)	10,21 (8,22–11,11)	15,01 (14,09–17,72) $p_0 = 0,038$	15,21 (14,23–17,37) $p_0 = 0,38$	8,04 (7,93–8,35) $p_0 = 0,034$ $p_1 = 0,029$ $p_2 = 0,047$	7,15 (6,91–7,76) $p_0 = 0,028$ $p_1 = 0,016$ $p_2 = 0,021$
Индекс иммунорегуляции (CD4/CD8), <i>Me</i> (Q_1-Q_3) Immune regulation index (CD4/CD8), <i>Me</i> (Q_1-Q_3)	1,63 (1,58–1,72)	1,51 (1,49–1,59)	1,48 (1,44–1,52)	1,89 (1,71–1,92) $p_0 = 0,033$ $p_1 = 0,045$ $p_2 = 0,047$	1,91 (1,87–1,94) $p_0 = 0,015$ $p_1 = 0,023$ $p_2 = 0,046$

Примечание. Здесь и в табл. 3: p_0-p_3 – уровни значимости по сравнению с группами I–V соответственно.
Note. Here and in table 3: p_0-p_3 – significance levels in comparison with groups I–V, respectively.

У больных АФП с I–II ст., напротив, наблюдалось незначительное увеличение исследуемых параметров (см. табл. 2). Установленная нами общая негативная корреляция ($r = -0,783$; $p = 0,031$) между относительным содержанием лимфоцитов и ст. фиброза у больных АФП находит отражение в исследованиях [11]. Более ранние работы L. Lombardo и соавт. свидетельствуют о взаимосвязи между уменьшением числа $CD3^+CD4^+$ и тяжестью течения цирроза печени [12].

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные роли лимфоцитов в патогенезе АБП, полученные результаты и их интерпретация являются крайне противоречивыми. Так, хроническое злоупотребление алкоголем у человека и в экспериментальных моделях (животные) способствует развитию лимфопении, нарушая баланс между различными субпопуляциями Т-клеток, а также оказывает влияние на их активацию и функциональный статус [10]. Группой авторов обнаружено, что у лиц, злоупотребляющих алкоголем без заболевания печени и у пациентов с алкогольным циррозом [13] значительная лимфопения опосредована равномерным уменьшением числа популяций $CD4$ и $CD8$ Т-лимфоцитов в циркуляции. Другие исследования, напротив, демонстрируют рост числа $CD3$ Т-клеток у хронических алкоголиков без АБП в основном за счет увеличения числа активированных цитотоксических лимфоцитов [14].

Лимфоциты $CD3^+CD8^+$ являются уникальной субпопуляцией [15], обладающей способностью модулировать свое окружение через секрецию различных медиаторов и прямую цитотоксичность [16]. Ранее было высказано предположение об участии $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов в повреждении печени. У обследованных нами пациентов с АФП на начальных и умеренных (I–II) ст. фиброза содержание (относительное) $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов было значительно выше соответствующих показателей здоровых доноров и лиц, не имеющих структурных и функциональных нарушений печени. Тогда как на более продвинутых стадиях заболевания регистрировалось значительное снижение абсолютного и относительного их содержания (см. табл. 2).

В некоторых работах было показано, что у человека и экспериментальных животных хроническое потребление этанола сопровождается увеличением числа и выраженной активацией популяций цитотоксических $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов, НК- и НКТ-клеток [8, 14], что предполагает потенциальную роль эффекторных цитотоксических клеток в формировании фиброза печени через механизмы иммуноопосредованного апоптоза гепатоцитов [8].

В то же время, согласно данным литературы, на более продвинутых ст. фиброза у пациентов с циррозом печени и активным потреблением этанола число цитотоксических $CD4/CD8$ и НКТ Т-клеток в циркуляции и их цитолитическая (цитотоксическая) активность *in vitro* снижаются наряду с повышенной продукцией у этой категории лиц факторов с профиброгенным действием IL-10 и TGF β [8]. Предполагают, что уменьшение числа пула цитотоксических клеток может быть обусловлено их усиленной миграцией в печень, что подтверждается присутствием активированных $CD4$ и $CD8$ Т-лимфоцитов в воспалительных печеночных инфильтратах при тяжелом фиброзе или циррозе алкогольной этиологии [2]. Эндотоксины (липополисахариды грамотрицательных бактерий), вырабатываемые кишечником, и продукты взаимодействия метаболитов этанола и клеточных структур, по-видимому, выступают в роли антигенов. В дополнение к вышесказанному, экспериментально было показано, что этанол дозозависимым образом индуцирует на $CD4$ и $CD8$ Т-лимфоцитах экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR3 и CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor 3, 4), а также молекул адгезии на эндотелии сосудов, в частности сосудистого эндотелия 1-го типа (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) и межклеточной адгезии (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), обеспечивая миграцию этих клеток в печень [17, 18]. Снижение числа цитотоксических Т-клеток в циркуляции на терминальных ст. фиброза (цирроза) может быть также опосредовано повышенной гибелью $CD8^+$ Т-клеток, индуцированной этанолом через митохондриальный путь апоптоза [19]. Кроме того, в литературе представлены сведения о фагоцитозе $CD8$ -лимфоцитов активированными ЗКП [20]. Следует отметить, что в условиях физиологической нормы высокое содержание активированных $CD8$ Т-клеток и $CD4/CD8$ Т-лимфоцитов памяти в печени связывают с механизмами утилизации этих клеток вследствие апоптотической гибели, индуцированной активацией антигеном [4].

Согласно полученным результатам, у больных АФП с III и IV ст. значения индекса иммунорегуляции (ИР) значимо превышали аналогичные показатели контроля, группы сравнения и лиц с АФП с меньшей стадией фиброза (см. табл. 2). Впервые лимфопения и увеличение ИР ($CD4/CD8$) у больных алкогольным циррозом с прогрессирующей печеночной недостаточностью были описаны P. Couzigou и соавт. [21], что было подтверждено и более поздними работами [11, 20].

Интересно отметить противоположную зависимость у больных вирусными гепатитами (отрицательные корреляции между значениями ИР и стадией фиброза печени) [20].

Особый интерес в нашем исследовании представляла оценка числа Т-клеток, несущих маркеры наивных Т-клеток (T_N , $CD3^+CD62L^+CD45R0^-/RA^+$), Т-лимфоцитов центральной (T_{CM} , $CD3^+CD62L^+CD45R0^+$) и эффекторной (T_{EM} , $CD3^+CD62L^-CD45R0^+$) иммунной памяти, а также терминальнодифференцированных эффекторов, реэкспрессирующих высокомолекулярную изоформу рецептора CD45 – CD45RA (T_{EMRA} , $CD3^+CD62L^-CD45R0^+$). Последние отличаются низкой теломеразной активностью, способностью продуцировать провоспалительные молекулы (в частности, фактор некроза опухолей (TNF) α), ростом экспрессии поверхностного маркера CD57, а также высоким внутриклеточным содержанием перфорина и гранзима А [21, 22]. Известно, что гетерогенные по фенотипическим, анатомическим и функциональным характеристикам субпопуляции Т-клеток памяти характеризуются ангиген-

независимой персистенцией, самообновлением и способностью к самоподдержанию, обеспечивая быстрый и эффективный ответ при повторном воздействии патогенов инфекционной и неинфекционной природы [23]. Этанол – небольшая молекула, и не может быть использована в качестве антигена для индукции иммунной реакции. Однако, учитывая его дозозависимое супрессорное влияние на иммунитет, а также способность метаболита этанола ацетальдегида образовывать ковалентные химические аддукты с белками, липидами и ДНК [24], ранее была выдвинута гипотеза о влиянии хронического употребления алкоголя на изменение (увеличение) числа Т-клеток с фенотипом лимфоцитов памяти в циркуляции.

Согласно полученным нами данным, у всех больных АФП, ранжированных по стадиям фиброза, регистрировалось достоверное увеличение процентного числа эффекторных Т-клеток памяти T_{EM} , в том числе T_{EMRA} , на фоне снижения содержания популяций T_N и T_{CM} по сравнению с параметрами условно здоровых доноров и пациентов без АФП (рис.).

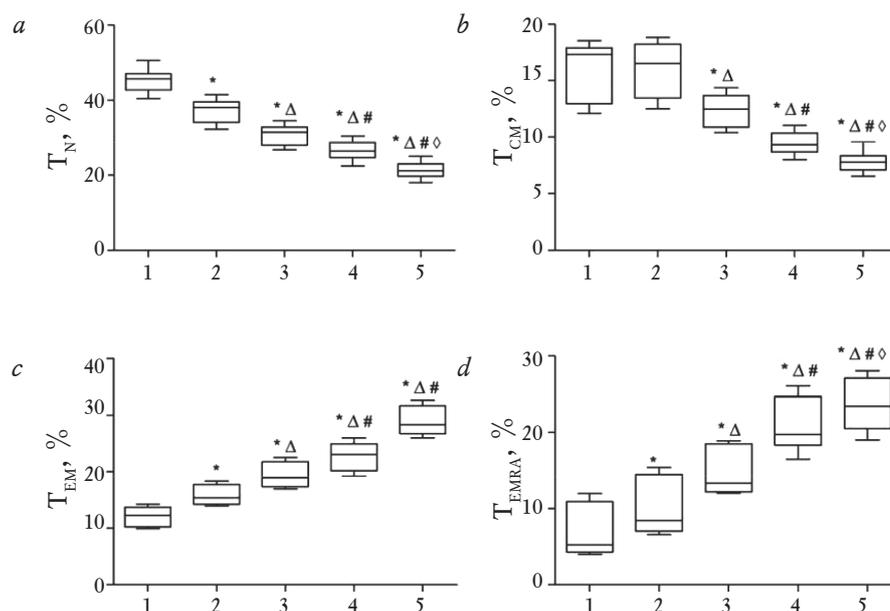


Рисунок. Содержание наивных Т-клеток (T_N)-А, Т-лимфоцитов центральной памяти (T_{CM})-Б, Т-клеток эффекторной памяти T_{EM} -В и терминально дифференцированных эффекторов (T_{EMRA})-Г в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени, ранжированных по стадиям, %, $Me (Q_1-Q_3)$: 1 – здоровые доноры ($n = 20$); 2 – больные без АФП ($n = 15$); 3 – больные I–II ст. ($n = 33$); 4 – больные III ст. ($n = 17$); 5 – больные IV ст. ($n = 12$). Достоверность различий $p \leq 0,05$: * относительно здоровых доноров, Δ – относительно больных без АФП, # – относительно I–II ст., ◊ – относительно III ст.

Figure. Content of naive T cells (T_N)-A, T-lymphocytes of central memory (T_{CM})-B, T-cells of effector memory (T_{EM})-B and terminal differentiated effectors (T_{EMRA})-G in peripheral blood of patients with alcoholic liver fibrosis, ranked by stages, %, $Me (Q_1-Q_3)$: 1 – healthy donors, $n = 20$; 2 – patients without ALF, $n = 15$; 3 – patients (I–II stages), $n = 33$; 4 – patients (III stage), $n = 17$; 5 – patients (IV stage), $n = 12$. Reliability of differences $p \leq 0,05$: * compared with healthy donors, Δ – compared with patients without ALF, # – compared with I–II stages, ◊ – compared with III stage.

Следует отметить, что у категории больных без АФП число эффекторов T_{EM} и T_{EMRA} также превышало показатели контрольной группы, содержание T_{CM} лимфоцитов не изменялось (регистрировалась тенденция к снижению), а число наивных T лимфоцитов было значительно ниже нормы ($\approx 15\%$).

Влияние злоупотребления алкоголем на конверсию фенотипа наивных T -лимфоцитов описано в литературе. Так, у взрослых мужчин, принимающих около 400 г этанола в день в течение примерно ($25,6 \pm 11,5$) лет, отмечалось сниженное число наивных (CD45RA) клеток в CD4/CD8 популяциях T -лимфоцитов, тогда как число примированных (CD45R0) T -клеток возрастало [5]. Аналогично в эксперименте на мышах (самцах и самках) хроническое потребление 20%-го этанола в питьевой воде в течение 6 мес уменьшало число наивных T -клеток и увеличивало долю T -клеток памяти в результате повышенной гомеостатической пролиферации последних, опосредованной лимфопенией [24].

В отличие от специфической антиген-зависимой активации T -клеток, гомеостатическая пролиферация, опосредованная лимфопенией при хроническом потреблении алкоголя, индуцируется стимуляцией собственными пептидами, приводя к экспансии множественных клонов, что способствует увеличению риска развития аутоиммунных расстройств [23, 25]. В целом повышение содержания T -клеток памяти связано с развитием хронических воспалительных заболеваний и возрастных патологий, таких как остеопороз, саркопения, болезнь Альцгеймера, аутоиммунные и онкологические заболевания, сердечно-сосудистая патология и др. [26, 27].

Обнаруженное нами снижение относительно числа лимфоцитов T_N и T_{CM} в крови больных АФП с терминальными ст. заболевания ассоциировалось с ростом количества эффекторных клеток T_{EM} и T_{EMRA} . Это позволяет нам предположить у этой категории больных факт прямой дифференцировки наивных T -клеток и T -лимфоцитов центральной памяти в эффекторные. Наше предположение подтверждается сильными корреляциями отрицательного характера между содержанием T_N с T_{EMRA} ($r = -0,863$; $p = 0,023$; $r = -0,773$; $p = 0,044$ для больных АФП с III и IV ст. фиброза) и T_{EM} ($r = -0,861$; $p = 0,038$ для больных АФП с IV ст. фиброза); T_{CM} с T_{EMRA} ($r = -0,731$; $p = 0,032$ для больных АФП с IV ст. фиброза) и T_{EM} (CD3⁺CD62L⁻CD45R0⁺) ($r = -0,891$; $p = 0,036$ для больных АФП с IV ст. фиброза). Результаты проведенного нами регрессионного анализа позволили продемонстрировать положи-

тельную зависимость содержания T_{EMRA} у больных АФП со ст. фиброза ($r^2 = 0,831$; $p = 0,028$) и отрицательную с числом наивных T -клеток ($r^2 = -0,761$; $p = 0,042$). У лиц, злоупотребляющих алкоголем, без АБП также были обнаружены негативные ассоциации между числом T_N с T_{EM} ($r = -0,522$; $p = 0,015$) и T_{CM} с T_{EM} ($r = -0,691$; $p = 0,031$). Выявленная нами взаимосвязь между числом T_{EMRA} клеток и содержанием CD8⁺ T -лимфоцитов у больных АФП с IV ст. фиброза ($r = 0,629$; $p = 0,041$) доказывает участие цитотоксических лимфоцитов в патогенезе АБП.

Таким образом, у лиц с хроническим активным злоупотреблением алкоголя на терминальных стадиях АФП снижение числа наивных T -лимфоцитов и T -клеток центральной памяти сопровождается образованием T -эффекторов (T_{EM} и T_{EMRA}) с высоким биоцидным потенциалом, что может усугублять течение тканедеструктивного процесса за счет экспрессии этими клетками молекул прямой цитотоксичности (гранзимы, перфорины) и продукции каскада медиаторов с провоспалительным действием. В то же время уменьшение пула наивных T -клеток у данной категории больных может быть ассоциировано с нарушением формирования эффективных иммунных реакций на инфекцию и вакцинацию.

Важная роль в защите организма от многочисленных патогенов и опухолевых клеток принадлежит механизмам врожденного иммунитета, представленного, в том числе, системой интерферонов и натуральными киллерами [28]. В литературе описаны антифибротические эффекты НК-клеток *in vivo* и *in vitro*, запуск которых происходит при повреждении печени [20]. С одной стороны, следует отметить протекторную роль НК-клеток в патогенезе фиброза, вирусных гепатитов и опухолевых заболеваний печени, с другой – участие некоторых субпопуляций этих клеток (в частности, iNKT-клетки, несущие инвариантный T -клеточный рецептор) в механизмах повреждения и воспалении печени не вызывает сомнения [28].

У пациентов с I–II ст. АФП относительное содержание НК-клеток (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) в периферической крови достоверно превышало значения условно здоровых доноров и было сопоставимым с результатами группы сравнения, тогда как у больных АФП с III–IV ст., напротив, регистрировалось снижение относительного числа CD3⁻CD16⁺CD56⁺ лимфоцитов (см. табл. 2).

В литературе существуют весьма разнонаправленные данные по влиянию этанола на НК-клетки. Некоторые авторы в эксперименте обнаружили способность алкоголя ингибировать цитолитиче-

скую функцию НК-клеток [29], тогда как другими группами были получены противоположные результаты [8]. Установлен интересный факт: снижение цитолитической активности натуральных киллеров при длительном воздействии этанола без патологии печени регистрируется на фоне повышения общей цитотоксичности, опосредованной другими клетками [8]. В то же время выявлено, что подавление функций НК-клеток печени при хроническом употреблении алкоголя способствует патогенезу АБП [30]. Уменьшение активности НК-клеток и их числа на периферии при АБП, возможно, связаны с избирательным хоумингом этих клеток в очаг воспаления в сочетании с этанолиндуцированным нарушением их продукции в костном мозге [30, 31].

Выявленные нами изменения пула естественных киллеров в циркуляции вполне согласуются с современной концепцией регрессии (разрешения) фиброза печени, основанной на запуске апоптоза активированных ЗКП, реализация которого может быть опосредована различными механизмами [28], где наиболее важным является активация НК-клеток интерферонами α , β и γ [32]. Учитывая, что $\approx 30\text{--}50\%$ лимфоцитов печени – НК-клетки, факт регуляции последними активности ЗКП представляется вполне логичным. Введение этанола в эксперименте значительно увеличивает резистентность ЗКП к апоптозу через угнетение активности НК-клеток и их способности продуцировать $\text{IFN}\gamma$ [30]. Показано, что хроническое потребление этанола ингибирует гибель активированных ЗКП, опосредованную НК-клетками, за счет подавления экспрессии активирующих рецепторов на НК-клетках, в частности NKG2D (natural killer group 2D), снижения синтеза апоптоз-индуцирующего лиганда семейства TNF (TNF -related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), гранзимов, перфорина и $\text{IFN}\gamma$ [33]. Кроме того, прием этанола стимулирует продукцию ЗКП $\text{TGF}\beta$; последний ингибирует функции НК-клеток [30].

Мы предполагаем, что уменьшение числа НК-клеток в периферической крови у хронических алкоголиков может способствовать снижению антифибротических эффектов этих клеток с утратой контроля над процессами фиброгенеза на терминальных ст. заболевания, индуцированного длительным приемом алкоголя. В-клетки в условиях физиологической нормы обеспечивают механизмы адаптивного (гуморального и клеточного) иммунитета за счет представления антигенов Т-клеткам, продукции специфических антител, секреции цитокинов и др. [34].

У обследованных нами лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, на начальных и уме-

ренных ст. фиброза печени, содержание (относительное и абсолютное) В-клеток ($\text{CD}3^+\text{CD}19^+$) в периферической крови было сопоставимым с контрольными значениями и группой сравнения; тогда как на III ст. фиброза регистрировалось значимое снижение относительного, а у больных циррозом (IV ст.) относительного и абсолютного количества этих клеток относительно контроля и группы лиц без АБП (см. табл. 2).

Полученные нами результаты в целом не противоречат данным литературы, согласно которым у больных циррозом печени с активным статусом потребления алкоголя, уровень В-лимфоцитов в периферической крови значительно снижается [8, 11]. Аналогичные изменения выявлены также у хронических алкоголиков без патологии печени [35], что не подтвердилось в нашем исследовании. Предполагают, что регистрируемая при хроническом злоупотреблении алкоголя В-лимфопения опосредована влиянием этанола на развитие В-клеток в костном мозге на уровне ранних предшественников [35]. Экспериментально доказано, что воздействие *in vitro* этанола на поздней стадии дифференцировки олигоклональных неонатальных клеток-предшественниц приводит к нарушению дифференцировки В-клеток за счет этанол-индуцированного угнетения экспрессии транскрипционных факторов – раннего фактора В-клеток (early B-cell factor, EBF) и критичного фактора коммутирования В-линии (paired box, Pax 5) [35].

Исследования с использованием животных (мыши) также продемонстрировали важную роль В-лимфоцитов в развитии фиброза печени. Ученые установили, что участие В-клеток в прогрессии дегенеративных изменений в печени, индуцированных токсическими факторами, не зависит от Т-клеток и антителогенеза (антительных реакций), а определяются их функциями в месте локализации (секреция цитокинов, межклеточные взаимодействия и т.д.) [35]. Императивная роль В-клеток выявлена также в патогенезе аутоиммунного диабета у мышей NOD (non-obese diabetic) [36] и волчаночного нефрита в полигенных, *fas*-интактных и *fas*-дефицитных моделях системного аутоиммунитета у генетически модифицированных MRL (Murphy Roth Large) мышей [37]. В обоих случаях антителонезависимый механизм вовлечения В-клеток в патогенез этих заболеваний оказался превалирующим [38].

В литературе также встречаются отдельные работы, свидетельствующие, что в контексте общей лимфопении при хроническом алкоголизме повышается относительное содержание В-клеток, продуцирующих неспецифические иммуноглобу-

лины (Ig) М и А на фоне снижения секреции IgG, что предполагает потенциальную роль этих изменений в формировании аутоиммунных и иммунодефицитных состояний при АБП [8, 11]. Таким образом, снижение числа В-клеток в периферической крови мы констатировали только на терминальных ст. фиброза. У пациентов, злоупотребляющих алкоголем, на начальных ст. заболевания и без АБП изучаемые параметры были сопоставимы с контрольными, что может свидетельствовать об относительной резистентности В-клеток к действию алкоголя и запуске компенсаторных механизмов, обеспечивающих гуморальные реакции на ауто- или эндотоксины, образующиеся вследствие токсического действия метаболитов этанола и повышенной проницаемости кишечной стенки.

Выход из костного мозга в кровь полипотентных и унипотентных стволовых клеток (мобилизация стволовых клеток), обладающих высокой пролиферативной активностью и регенерационным потенциалом, и их миграция в поврежденные участки являются адаптивной реакцией организма, развивающейся в ответ на повреждение органов и тканей. Претенденты на стволовые гемопоэтические клетки (CD34,

CD133) как в составе первичной суспензии клеток фетальной печени, так и в изолированном виде обладают высокой колониеобразующей активностью и ярко выраженной способностью к мультинаправленной дифференцировке [39]. Определена способность циркулирующих стволовых клеток с фенотипом CD34⁺CD45⁻ дифференцироваться в эпителиальные клетки кожи и клетки желудочно-кишечного тракта и гепатоциты [40]. Широко обсуждается вопрос о способе дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток в гепатоциты, в частности за счет механизмов слияния и трансдифференцировки [39]. Согласно полученным нами результатам, содержание клеток CD45⁺CD34⁺/CD133⁺ в образцах периферической крови пациентов с АФП на начальных и умеренных ст. фиброза значительно превышало контрольные цифры в среднем в 2,5 раза, а также показатели группы сравнения (\approx в 1,4 раза). У больных хроническим алкоголизмом с АФП на терминальных ст. фиброза число CD34 и CD133 позитивных клеток в образцах периферической крови значительно снижалось относительно результатов контроля и группы сравнения (табл. 3).

Т а б л и ц а 3
T a b l e 3

Содержание гемопоэтических клеток (CD45⁺ CD34⁺ / CD133⁺) в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени, ранжированных по стадиям, $Me (Q_1-Q_3)$

The content of hemopoietic cells (CD45⁺ CD34⁺ / CD133⁺) in the peripheral blood of patients with alcoholic liver fibrosis ranked by stages, $Me (Q_1-Q_3)$

Показатель Characteristic	Обследованные Examined				
	Здоровые доноры $n = 20$ Healthy donors $n = 20$	Без АФП $n = 15$ Without ALF $n = 15$	I–II ст. $n = 33$ I–II stages $n = 33$	III ст. $n = 17$ III stage $n = 17$	IV ст. $n = 12$ IV stage $n = 12$
	I	II	III	IV	V
CD45 ⁺ CD34 ⁺ , 10% CD45 ⁺ CD34 ⁺ , 10%	0,054 (0,041–0,061)	0,059 (0,046–0,062)	0,123 (0,101–1,145) $p_0 = 0,030$ $p_1 = 0,045$	0,033 (0,029–0,038) $p_0 = 0,021$ $p_1 = 0,035$ $p_2 = 0,043$	0,014 (0,005–0,021) $p_0 = 0,029$ $p_1 = 0,018$ $p_2 = 0,037$ $p_3 = 0,015$
CD45 ⁺ CD34 ⁺ , %	1,92 (1,85–1,98)	2,35 (1,41–2,62) $p_0 = 0,035$	4,45 (3,02–4,54) $p_0 = 0,041$ $p_1 = 0,025$	1,25 (1,18–1,35) $p_0 = 0,018$ $p_1 = 0,029$ $p_2 = 0,034$	0,91 (0,87–0,95) $p_0 = 0,025$ $p_1 = 0,048$ $p_2 = 0,031$ $p_3 = 0,044$
CD45 ⁺ CD133 ⁺ , 10% CD45 ⁺ CD133 ⁺ , 10%	0,035 (0,029–0,041)	0,049 (0,034–0,056) $p_0 = 0,451$	0,089 (0,076–0,101) $p_0 = 0,034$ $p_1 = 0,029$	0,032 (0,025–0,039) $p_0 = 0,021$ $p_1 = 0,045$ $p_2 = 0,048$	0,011 (0,005–0,019) $p_0 = 0,016$ $p_1 = 0,032$ $p_2 = 0,044$ $p_3 = 0,018$

Продолжение табл. 3
End of table 3

Показатель Characteristic	Обследованные Examined				
	Здоровые доноры <i>n</i> = 20 Healthy donors <i>n</i> = 20	Без АФП <i>n</i> = 15 Without ALF, <i>n</i> = 15	I–II ст. <i>n</i> = 33 I–II stages <i>n</i> = 33	III ст. <i>n</i> = 17 III stage <i>n</i> = 17	IV ст. <i>n</i> = 12 IV stage <i>n</i> = 12
	I	II	III	IV	V
CD45 ⁺ CD133 ⁺ , %	1,28 (1,23–1,32)	1,83 (1,79–1,87) <i>p</i> ₀ = 0,047	3,28 (3,08–3,85) <i>p</i> ₀ = 0,020 <i>p</i> ₁ = 0,044	1,21 (1,09–1,32) <i>p</i> ₀ = 0,039 <i>p</i> ₁ = 0,045 <i>p</i> ₂ = 0,030	0,72 (0,61–0,83) <i>p</i> ₀ = 0,023 <i>p</i> ₁ = 0,035 <i>p</i> ₂ = 0,031 <i>p</i> ₃ = 0,048

Полученные нами результаты у больных АФП на начальных и умеренных ст. фиброза частично согласуются с данными мировой литературы. Установлено, что при хронических заболеваниях печени, ассоциированных со снижением регенеративной способности гепатоцитов, регистрируются мобилизация стволовых гемопоэтических клеток из костного мозга и повышение их уровня в циркуляции и печени, опосредованные активацией миграционной оси, образованной хемокином, фактором стромальных клеток 1 (stromal cell-derived factor, SDF-1) и его рецептором CXCR4 [40, 41].

Как уже упоминалось ранее, воспаление является критическим фактором в инициации и поддержании процессов фиброгенеза печени и цирроза в результате действия различных гепатотоксических факторов.

Реакции воспаления с высвобождением медиаторов с провоспалительным действием (таких как IL-1α, IL-6 и TNFα) из поврежденных клеток способствуют рекрутингу реактогенных циркулирующих клеток крови в печень [41].

Логично предположить, что повышенные уровни клеток CD34 и CD133 в периферической крови пациентов, злоупотребляющих алкоголем, на начальных ст. фиброза связаны с персистирующим воспалением в паренхиме печени и дисбалансом между процессами ее повреждения, а также эндогенными репаративными возможностями. Следует отметить, что CD34 является маркером эндотелиальных клеток при хронических дегенеративных заболеваниях печени, характеризующихся капилляризацией синусоидов. Выраженность экспрессии CD34 имеет четкую ассоциацию с тяжестью поражения печеночной паренхимы. В то же время установлено, что часть клеток CD34, обнаруживаемых в печени, являются гемопоэтическими и принимают участие в ее регенерации [42].

В настоящее время инфузия клеток CD34 и CD133 в воротную вену и чревный ствол [42, 43], печеночную артерию пациентам с терминальной стадией цирроза печени может улучшить их клиническое состояние. Аналогичные исследования также показали, что стволовые гемопоэтические клетки, с одной стороны, способствуют регенерации и восстановлению функции печени в результате травмы [44].

С другой стороны, снижение количества клеток CD34 и CD133 в циркуляции на терминальных стадиях фиброза у обследованных нами пациентов, злоупотребляющих алкоголем, может свидетельствовать о нарастающей декомпенсации и истощении регенераторного потенциала организма на финальных стадиях дегенеративного процесса. Оценка содержания CD34- и CD133-позитивных клеток в периферической крови может быть использована как важный прогностический критерий, свидетельствующий о регенеративной активности организма в ответ на повреждение печеночной паренхимы.

В целом выяснение роли нарушений межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток и гепатоцитов, индуцированных гепатотоксическими факторами, значительно расширит представления о фундаментальных механизмах, опосредующих патологическое ремоделирование печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных АФП с терминальными (III–V) ст. фиброза на фоне лимфопении регистрируется снижение (относительно контроля и группы сравнения) содержания основных субпопуляций лимфоцитов: CD45⁺CD3⁺, CD45⁺CD3⁺CD4⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺, CD45⁺CD3⁻CD19⁺ и CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺, тогда как на начальных и умеренных (I–II) ст. выявлено повышение изучаемых показателей. Обнаружена негативная ассоциация

относительного числа лимфоцитов (CD45) со стадией фиброза печени.

Снижение числа НК-клеток в периферической крови у хронических алкоголиков на терминальных стадиях заболевания может способствовать угнетению их антифибротических эффектов.

У всех больных АФП выявлено достоверное увеличение содержания (%) эффекторных Т-клеток памяти T_{EM} , в том числе T_{EMRA} , на фоне снижения популяций T_N и T_{CM} по сравнению с параметрами условно здоровых доноров и пациентов без АФП. Обнаруженные нами изменения на продвинутых стадиях фиброза позволяют предположить факт прямой дифференцировки наивных Т-клеток и Т-лимфоцитов центральной памяти в эффекторные, что может усугублять течение тканедеструктивного процесса за счет высокой биоцидной активности эффекторных клеток и их миграции в очаг повреждения.

Высокий уровень (относительно результатов контроля и группы сравнения) гемопоэтических (CD34 и CD133) клеток у больных АФП на начальных и умеренных стадиях фиброза значительно снижается на более продвинутых, что свидетельствует о декомпенсации и истощении регенераторного потенциала организма на финальных стадиях дегенеративного процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- World Health Organization. World Health Report 2011: Global status report on alcohol and health. Switzerland, 2011: 286.
- Celli R., Zhang X. Pathology of alcoholic liver disease. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2014; 2(2): 103–109. DOI: 10.14218/JCTH.2014.00010.
- Miller A.M., Horiguchi N., Jeong W.I., Radaeva S., Gao B. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2011; 35 (5): 787–793. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2010.01399.x.
- Robinson M.W., Harmon C., O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular and Molecular Immunology*. 2016; 13 (3): 267–276. DOI: 10.1038/cmi.2016.3.
- Barr T., Helms C., Grant K. Messaoudi I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2016; 65: 242–251. DOI: org/10.1016/j.pnpbp.2015.09.001.
- Curtis B.J., Zahs A., Kovacs E.J. Epigenetic targets for reversing immune defects caused by alcohol exposure. *Alcohol. Res.* 2013; 35 (1): 97–113.
- Кремер Н.Ш. Высшая математика для экономистов. М.: Юнити, 2004: 472. [Kremer N.Sh. Higher mathematics for economists. Moscow: Unity, 2004: 472 (in Russ.)].
- Laso F.J., Almeida J., Torres E., Vaquero J.M., Marcos M., Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with an increased cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver injury. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2010; 34 (5): 876–885. DOI: org/10.1111/j.1530-0277.2010.01160.x.
- Газатова Н.Д., Юрова К.А., Гаврилов Д.В., Литвинова Л.С. Алкоголь и иммунитет. Гены и Клетки. 2018; 13 (1): 47–55. [Gazatova N.D., Yurova K.A., Gavrilov D.V., Litvinova L.S. *Alcohol and immunity. Genes and Cells*. 2018; 13 (1): 47–55 (in Russ.)].
- Pasala S., Barr T., Messaoudi I. Impact of alcohol abuse on the adaptive immune system. *Alcohol. Res.* 2015; 37 (2): 185–197.
- Matos L.C., Batista P., Monteiro N., Ribeiro J., Cipriano M.A., Henriques P., Fernando G. Carvalho A. Lymphocyte subsets in alcoholic liver disease. *World Journal of Hepatology*. 2013; 5 (2): 46–55. DOI: 10.4254/wjh.v5.i2.46.
- Lombardo L., Capaldi A., Poccardi G., Vineis P. Peripheral blood CD3 and CD4 T-lymphocyte reduction correlates with severity of liver cirrhosis. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1995; 25: 153–156.
- Naude C.E., Bouic P., Senekal M., Kidd M., Ferrett H.L., Fein G., Carey P.D. Lymphocyte measures in treatment-naïve 13-15-year old adolescents with alcohol use disorders. *Alcohol*. 2011; 45: 507–514. DOI: 10.1016/j.alcohol.2011.02.307.
- Arosa F.A., Porto G., Cabeda J.M., Lacerda R., Resende D., Cruz E., Cardoso C., Fonseca M., Simxes C., Rodrigues P. Expansions of CD8+CD28- and CD8+T-cRVbeta5.2+ T cells in peripheral blood of heavy alcohol drinkers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2000; 24: 519–527. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2000.tb02020.x.
- Zaldivar Fujigaki J.L., Arroyo Valerio A.G., Lypez Alvarenga J.C., Gutiérrez Reyes E.G., Kershenobich D., Hernández Ruiz J. Alterations in activation, cytotoxic capacity and trafficking profile of peripheral CD8 T-cells in young adult binge drinkers. *PLoS One*. 2015; 10 (7): e0132521. DOI: 10.1371/journal.pone.0132521.
- Kaech S.M., Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 2012; 12 (11): 749–761.
- Safadi R., Ohta M., Alvarez C.E., Fiel M.I., Bansal M., Mehal W.Z., Friedman S.L. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin – 10 from hepatocytes. *Gastroenterology*. 2004; 127 (3): 870–882. DOI: 10.1038/nri3307.
- Karim S., Liaskou E., Hadley S., Youster J., Faint J., Adams D.H., Lalor P.F. An in vitro model of human acute ethanol exposure that incorporates CXCR3 – and CXCR4-dependent recruitment of immune cells. *Toxicol. Sci.* 2013; 132 (1): 131–141. DOI: 10.1093/toxsci/kfs337.
- Szuster-Ciesielska A., Daniluk J., Bojarska-Junak A. Apoptosis of blood mononuclear cells in alcoholic liver cirrhosis. The influence of in vitro ethanol treatment and zinc supplementation. *Toxicology*. 2005; 212 (2–3): 124–134. DOI: 10.1016/j.tox.2005.04.009.

20. Muhanna N., Doron S., Wald O., Horani A., Eid A., Pap-
po O., Friedman S.L., Safadi R. Activation of hepatic
stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: a novel
pathway of fibrogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md)*.
2008; 48 (3): 963–977. DOI: 10.1002/hep.22413.
21. Couzigou P., Vincendeau P., Fleury B., Richard-Molard
B., Pierron A., Bergeron J.L., Bezian J.H., Amouretti M.,
Bйraud C. Changes in circulating lymphocyte subsets in
alcoholic hepatopathies. Respective role of alcohol, he-
patocellular insufficiency and malnutrition. *Gastroenterol.
Clin. Biol.* 1984; 8 (12): 915–919.
22. Matsuki F., Saegusa J., Miyamoto Y., Misaki K., Kum-
agai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(high) activated/
effector regulatory T cells in the CCR7⁺ CD45RA⁻CD27⁺
CD28⁺ central memory subset are decreased in peripheral
blood from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem.
Biophys. Res. Commun.* 2013; 438 (4): 778–783. DOI:
10.1016/j.bbrc.2013.05.120.
23. Bhargava P. Novel therapies for memory cells in au-
toimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 2015; 180 (3):
353–360. DOI: 10.1111/cei.12602.
24. Zhang H., Meadows G.G. Chronic alcohol consumption
in mice increases the proportion of peripheral memory
T-cells by homeostatic proliferation. *Journal of Leuko-
cyte Biology.* 2005; 78 (5): 1070–1080.
25. Min B., Foucras G., Meier-Schellersheim M., Paul, W.E.
Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells
determined by the diversity of the memory cell repertoire.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 101 (11): 3874–3879.
26. Chou J.P., Effros R.B. T-cell replicative senescence in hu-
man aging. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19 (9): 1680–1698.
27. Appay V., Sauce D. Naive T-cells: the crux of cellu-
lar immune aging? *Exp. Gerontol.* 2014; 54: 90–93. DOI:
10.1016/j.exger.2014.01.003.
28. Peng H., Wisse E., Tian Z. Liver natural killer cells: sub-
sets and roles in liver immunity. *Cell Mol. Immunol.*
2016; 13(3): 328–336. DOI: 10.1038/cmi.2015.96.
29. Zhou J., Meadows G.G. Alcohol consumption decreases
IL-2-induced NF b kappaB activity in enriched NK cells
from C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 2003; 73 (1): 72–79.
30. Jeong W.I., Park O., Gao B. Abrogation of the anti-
fibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma
contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gas-
troenterology.* 2008; 134 (1): 248–258. DOI: 10.1053/j.
gastro.2007.09.034.
31. Zhang F., Little A., Zhang H. Chronic alcohol consumption
inhibits peripheral NK cell development and maturation by
decreasing the availability of IL-15. *J. Leukoc. Biol.* 2017;
101 (4): 1015–1027. DOI: 10.1189/jlb.1A0716-298RR.
32. Jeong W.I., Gao B. Innate immunity and alcoholic liver
fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 23 (1): 112–118.
DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05274.x.
33. Pan H.N., Sun R., Jaruga B., Hong F., Kim W.H., Gao B.
Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer
cell activity and accelerates murine cytomegalovirus-induced
hepatitis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2006; 30 (9): 1615–1623.
34. Zeiser R., Sarantopoulos S., Blazar B. R. B-cell target-
ing in chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2018; 131
(13): 1399–1405. DOI: 10.1182/blood-2017-11-784017.
35. Wang H., Zhou H., Mahler S., Chervenak R., Wolcott M.
Alcohol Affects the Late Differentiation of Progenitor B
Cells. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*.
2011; 46 (1): 26–32. DOI: 10.1093/alcalc/agq076.
36. Serreze D.V., Chapman H.D., Varnum D.S., Hanson M.S.,
Reifsnnyder P.C., Richard S.D., Fleming S.A., Leiter E.H.,
Shultz L.D. B lymphocytes are essential for the initiation
of T-cell –mediated autoimmune diabetes: analysis of a
new “speed congenic” stock of NOD. Ig mu null mice.
J. Exp. Med. 1996; 184 (5): 2049–2053.
37. Chan O.T., Madaio M.P., Shlomchik M.J. B cells are
required for lupus nephritis in the polygenic, Fas–in-
tact MRL model of systemic autoimmunity. *J. Immunol.*
1999; 163 (7): 3592–3596.
38. Novobrantseva T.I., Majeau G.R., Amatucci A., Ko-
gan S., Brenner I., Casola S., Mark J. Shlomchik, Kote-
liansky, Hochman P.S., Ibraghimov A. Attenuated liver
fibrosis in the absence of B-cells. *Journal of Clinical
Investigation.* 2005; 115 (11): 3072–3082.
39. Lizier M., Castelli A., Montagna C., Lucchini F., Vezzoni
P., Faggioli F. Cell fusion in the liver, revisited. *World J.
Hepatol.* 2018; 10 (2): 213–221. DOI: 10.4254/wjh.v10.i2.213.
40. K6rbling M., Katz R.L., Khanna A., Ruifrok A.C., Rondon G.,
Albitar M., Champlin R.E., Estrov Z. Hepatocytes and ep-
ithelial cells of donor origin in recipients of peripheral –
blood stem cells. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346 (10): 738–746.
41. Abdellatif H. Circulating CD34⁺ hematopoietic stem/
progenitor cells paralleled with level of viremia in pa-
tients chronically infected with hepatitis B virus. *Regen
Med. Res.* 2018. 6: 1. DOI: 10.1051/rmr/170005.
42. Бурганова Г.Р., Абдулхаков С.Р., Гумерова А.А., Гази-
зов И.М., Йылмаз Т.С., Титова М.А., Одинцова А.Х.,
Кундакчян Г.Г., Фаррахов А.З., Киясов А.П. CD34,
α-SMA и BCL-2 как маркеры эффективности трансплан-
тации аутологичных гемопоэтических стволовых кле-
ток больным алкогольным циррозом печени. *Экспери-
ментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2012; 9:
16–22. [Burganova G.R., Abdulkhakov S.R. Gumerova A.A.
Gazizov I.M. Yylmaz T.S. Titova M.A. Odintsova A.Kh.,
Kundakchyan G.G., Farrakhov A.Z., Kiyasov A.P. CD34,
α-SMA and BCL-2 as markers of transplantation efficiency
of autologous hematopoietic stem cells in patients with
alcoholic liver cirrhosis. *Experimental and clinical
gastroenterology.* 2012; 9: 16–22 (in Russ.)].
43. Salama H., Zekri A.R., Bahnassy A.A., Medhat E., Ha-
lim H.A., Ahmed O.S., Mohamed G., Al Alim S.A., She-
rif G.M. Autologous CD34⁺ and CD133⁺ stem cells
transplantation in patients with end stage liver disease.
World J. Gastroenterol. 2010; 16 (42): 5297–5305.
44. Kwak K.-A., Cho H.-J., Yang J.-Y., Park Y.-S. Current
Perspectives Regarding Stem Cell-Based Therapy for Liver
Cirrhosis. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepa-
tology.* 2018; ID 4197857: 19. DOI: 10.1155/2018/4197857.

Вклад авторов

Газатова Н.Д. – проведение практической части исследования. Юрова К.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Гаврилов Д.В. – проведение практической части исследования, разработка дизайна, анализ и интерпретация клинических данных. Вульф М.А., Тодосенко Н.М. – проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных. Новицкий В.В. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Литвинова Л.С. – разработка дизайна, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи.

Сведения об авторах

Газатова Наталья Динисламовна, науч. сотрудник, Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0002-4646-3436.

Юрова Кристина Алексеевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0001-6146-3330.

Гаврилов Дмитрий Владимирович, зав. наркологическим отделением, врач-психиатр, нарколог, Наркологический диспансер Калининградской области, г. Калининград. ORCID iD 0000-0002-8871-2808.

Вульф Мария Александровна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0002-4989-045X.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

Тодосенко Наталья Михайловна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0001-7468-4861.

Литвинова Лариса Сергеевна, д-р мед. наук, зав. Базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0001-5231-6910.

(✉) Литвинова Лариса Сергеевна, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

Поступила в редакцию 18.09.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Authors contribution

Gazatova N.D. – carrying out the research. Yurova K.A. – conception and design, analysis and interpretation of the data. Gavrilov D.V. – carrying out of the research, conception and design, analysis and interpretation of the data. Vulf M.A., Tudosenko N.M. – carrying out of the research, analysis and interpretation of the data. Novitsky V.V. – conception and design, critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication. Litvinova L.S. – conception and design, analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript.

Authors information

Gazatova Natalya D., Researcher, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4646-3436.

Yurova Kristina A., PhD, Researcher Fellow, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-6146-3330.

Gavrilov Dmitry V., Head of the DDKG, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8871-2808.

Vulf Mariia A., PhD, Researcher Fellow, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4989-045X.

Novitskiy Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

Tudosenko Natalia M., PhD, Researcher Fellow, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-7468-4861.

Litvinova Larisa S., DM, Head of the Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5231-6910.

(✉) Litvinova Larisa S., e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

Received 18.09.2018
Accepted 17.12.2018