

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

На правах рукописи

Газатова Наталья Динисламовна

**ИЗМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И ГУМОРАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ
ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ ФИБРОЗЕ ПЕЧЕНИ**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Л.С. Литвинова

Калининград – 2019

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Иммунологическая структура печени	13
1.1.1. Миелоидные популяции клеток печени	14
1.1.2. Лимфоидные иммунные клетки печени	15
1.1.3. Гемопоэтические клетки-предшественницы печени	17
1.1.4. Роль негемопоэтических клеток печени в иммунорегуляции	17
1.2. Роль микроокружения печени в иммунорегуляции	18
1.3. Воспалительные процессы в здоровой печени. Иммунная толерантность печени	19
1.4. Системный гомеостаз и фаза острого ответа	21
1.5. Иммуитет печени и процессы фиброгенеза/фибролиза	22
1.6. Воспаление и регенерация печени	25
1.7. Краткая характеристика действия этанола. Метаболизм этанола	26
1.8. Краткие сведения об алкогольной болезни печени	28
1.9. Влияние алкоголя на врожденный иммунитет	29
1.10. Влияние алкоголя на адаптивный иммунитет	36
1.11. Влияние алкоголя на гуморальные факторы	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	44
2.1. Объект исследования	44
2.2. Материал исследования	46
2.3. Методы исследования	46
2.3.1. Исследование биохимических показателей крови	47
2.3.2. Определение содержания молекул внеклеточного матрикса (TIMP-1, коллагена IV типа, ГК, P-III-NP) в сыворотке крови	49

2.3.3. Определение содержания молекул с про (IL-6, IL-8, TNF α) и антивоспалительным (IL-10 и TGF- β 1) действием в сыворотке крови	50
2.3.4. Определение концентрации лептина и адипонектина в плазме крови	51
2.3.5. Иммунофенотипический анализ лимфоцитов в образцах лизированной венозной крови	52
2.3.6. Определение фагоцитарной активности моноцитов периферической крови	54
2.3.7. Методы статистического анализа данных	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	57
3.1. Оценка биохимических параметров у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса	57
3.2. Оценка содержания молекул внутриклеточного матрикса в сыворотке крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса	60
3.3. Оценка уровня факторов с про- (IL-6, IL-8, TNF α , <i>лептин</i>) и антивоспалительным (IL-10, TGF- β 1, адипонектин) в сыворотке/плазме крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса	62
3.4. Оценка основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса	65
3.5. Оценка содержания гемопоэтических клеток (CD45 ⁺ CD34 ⁺ / CD133 ⁺) в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса	71
3.6. Оценка содержания наивных Т-клеток (T _N), Т-лимфоцитов центральной памяти (T _{CM}), Т-клеток эффекторной памяти (T _{EM}) и терминально-дифференцированных эффекторов (T _{EMRA}) (%) в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса	73
3.7. Оценка содержания моноцитов в периферической крови и их кислородзависимой бактерицидности в НСТ-тесте у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	81
ВЫВОДЫ	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	110

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБП - алкогольная болезнь печени
АПК - антиген-презентирующие клетки
АсАТ - аспаргатаминотрансфераза
АлАТ - аланинаминотрансфераза
АФК - активные формы кислорода
АФП – алкогольный фиброз печени
БОФ - острофазные белки
ВКМ - внеклеточный матрикс
ГГТ - гамма-глутамилтрансфераза
ГК – гиалуриновая кислота
ДК - дендритные клетки
ЖТ – жировая ткань
ЗКП - звездчатые клетки печени (клетки Ито)
КК - клетки Купфера
ЛПС- липополисахарид
СЭК - синусоидальные эндотелиальные клетки
ЩФ - щелочная фосфатаза
DAMPs – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями
HGF – фактор роста гепатоцитов
ICAM-1 - молекулы межклеточной адгезии 1-го типа
IFN – интерферон
IKK – I κ B α киназа
IL - интерлейкин
MCP-1 - фактор хемотаксиса моноцитов
MIF - фактор ингибирования миграции макрофагов
MMP-1 –матричная металлопротеиназа-1
NF κ B - транскрипционный фактор «каппа-би»
NK – натуральные киллеры
PAMPs - патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PRR - рецепторы распознавания паттернов
P-III-N - N-концевой пептид проколлагена типа III
TGF- β 1 - трансформирующий ростовой фактор, бета-1
TNF α - фактор некроза опухоли альфа
TIMP-1 - тканевой ингибитор металлопротеиназ-1
TLR – толл-подобные рецепторы
VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Проблема хронических диффузных заболеваний печени, включая стеатоз, гепатит, фиброз и цирроз, относится к приоритетам национальных систем здравоохранения индустриально-развитых стран мира, занимая ведущие позиции в структуре смертности населения (WHO 2011; Celli R., Zhang X. 2014; Nagy L.E. 2015). Преобладающим этиологическим фактором в патогенезе хронических заболеваний печени является длительное употребление алкоголя (Miller A.M. et al., 2011; Nagy L.E. 2015; Gao B. et al., 2019).

Цикличность процессов повреждения/репарации гепатоцитов при диффузном фиброгенезе, индуцированном большинством гепатотоксических факторов, характеризуется чрезмерным отложением в печени компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ: коллаген, гликопротеины и гиалуронаты), молекулярная и гистологическая перегруппировка которых опосредует структурные и функциональные нарушения в органе (Miller A.M. et al., 2011; Celli R., Zhang X., 2014; Nagy L.E., 2015). Активация системных и/или локальных универсальных механизмов продуктивного воспаления, направленных на элиминацию гепатотропных агентов и/или токсических продуктов метаболизма, в целом, опосредует нарушение тканевого гомеостаза органа и способствует прогрессии фиброгенеза с формированием цирроза и хронической печеночной недостаточности (Arroyo V. et al., 2016; Lange C. M., Moreau R. 2018). Отражением всех вышеперечисленных процессов является изменение биохимических, гуморальных и клеточных параметров. Многочисленные исследования, касающиеся роли системы крови, как интегральной системы гомеостаза организма обуславливают актуальность и своевременность изучения ее морфофункциональных изменений при этанол-индуцированном фиброзе.

Степень разработанности темы. Накопление компонентов ВКМ в функциональных межклеточных пространствах Диссе приводит к нарушению обмена метаболитами между гепатоцитами и синусоидными капиллярами крови, индуцирует развитие гипоксии печеночной паренхимы с вовлечением гепатоцитов в процесс жирового гепатоза (Lieber C.S. et al., 2008). Ключевую роль в патогенезе алкогольной болезни печени (АБП) играют провоспалительные реакции (Gao B. et

al., 2019) (ауто)иммунного характера. Гиперактивация компонентов врожденного иммунитета, как в крови, так и в тканях печени опосредована, преимущественно, бактериальными токсинами, проникающими в системный кровоток вследствие повышенной проницаемости кишечной стенки и сниженной барьерной функции печени), гипоксией, а также токсическими продуктами метаболизма этанола и профиброгенными метаболитами (в т.ч. ацетальдегид, пероксиды липидов) (Miller A.M. et al., 2011; Kuprys P.V. et al., 2018; Rosińska J. et al., 2019).

Высокий уровень активных форм кислорода (АФК) и широкого спектра молекул с провоспалительным, хемотаксическим и фиброгенным действием стимулирует трансформацию резидентных звездчатых клеток печени (ЗКП, клетки Ито) в миофибробласты, продуцирующие компоненты ВКМ; способствует миграции иммунокомпетентных клеток из кровотока в очаг повреждения, что усиливает инфильтративный компонент воспаления и усугубляет, тем самым, повреждение паренхимы печени (Barr T. et al., 2016). Таким образом, формируется "порочный круг" постнекротического продуктивного воспаления с аутоиммунным компонентом с исходом в прогрессирующий фиброз и извращенную регенерацию печени. Хроническое злоупотребление алкоголем также влияет морфофункциональные характеристики популяций клеток адаптивного иммунитета (Fujigaki J.L. et al., 2015; Robinson M.W. et al., 2016), способствует развитию лимфопении, протекающей с увеличением числа активированных Т-клеток в циркуляции вследствие их гомеостатической пролиферации (Barr T. et al., 2016). Тем не менее, механизмы этанолиндукцированного фиброгенеза до конца не расшифрованы. В связи с этим, научный интерес к оценке морфофункциональных особенностей крови у больных АБП остается высоким, что обуславливает активное изучение механизмов регуляции воспалительных и регенеративных реакций, возникающих в ответ на повреждение гепатоцитов с исходом в фиброз.

В связи с вышесказанным, **целью нашего исследования** явилось определение клеточных и гуморальных показателей крови у пациентов с алкогольным фиброзом печени и выявление связи морфофункциональных изменений крови с патологическими изменениями в печени, формирующимися на разных стадиях этанол-индуцированного фиброза.

Задачи исследования:

1. Провести комплексное исследование биохимических показателей крови и оценить уровень молекул внеклеточного матрикса соединительной ткани в крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса.
2. Исследовать уровни факторов с про- и антифиброгенным действием в крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса.
3. Оценить субпопуляционный состав лимфоцитов, определить содержание гемопоэтических стволовых клеток в образцах крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса.
4. Определить уровень корреляций клеточных и гуморальных показателей крови с патологическими изменениями, в зависимости от стадии алкогольного фиброза печени.

Научная новизна. В работе представлены результаты комплексного исследования морфофункциональных характеристик крови на разных стадиях этанол-индуцированного фиброза. Впервые продемонстрировано, что степень увеличения активности ферментов печени (АсАТ, ГГТ), значений коэффициента де Ритиса, а также повышение концентрации молекул внеклеточного матрикса (тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы-1 (TIMP-1), коллагена IV типа, гиалуроновой кислоты (ГК)) в крови у больных АФП коррелируют со стадией патологического процесса и могут рассматриваться как индикаторы прогрессии заболевания. Приоритетными являются данные о том, что при хроническом злоупотреблении алкоголем, приводящем к развитию фиброза печени, в сыворотке крови, наряду с достоверным повышением уровня медиаторов с провоспалительным действием (*IL-6, IL-8, TNF α и лептин*), регистрируется повышение содержания противовоспалительных факторов (*IL-10, TGF- β 1*), что ведет к формированию гуморального дисбаланса у этой категории пациентов. Впервые представлены доказательства, что в прогрессировании этанол-индуцированного фиброза печени важная роль принадлежит дисрегуляции взаимодействий

медиаторов жировой ткани, адипонектина и лептина, с преобладанием последнего. Продемонстрировано, что при лимфопении на терминальных стадиях фиброза, на фоне снижения содержания наивных (T_N) и Т-лимфоцитов центральной памяти (T_{CM}), регистрируется рост числа Т-эффекторных клеток памяти (T_{EM} и T_{EMRA}) с высокой провоспалительной активностью, что свидетельствует о факте их прямой дифференцировки из T_N и T_{CM} лимфоцитов. Значимое увеличение содержания эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM} и T_{EMRA}), ассоциированное со стадией заболевания, и моноцитов с высоким биоцидным потенциалом, наряду с наличием позитивных ассоциаций с молекулами внеклеточного матрикса и провоспалительными факторами, свидетельствует о роли этих клеток в процессах фиброгенеза. Убедительно продемонстрировано, что у больных АФП негативные корреляции между уровнем Т-регуляторных клеток и продуцируемых ими факторов с супрессорным действием (IL-10 и TGF- β 1) с содержанием естественных киллеров (NK-клетки) в крови, свидетельствуют о снижении антифибротических эффектов последних с утратой контроля над процессами фиброгенеза на терминальных стадиях заболевания, индуцированного хроническим приемом алкоголя. Приоритетными являются данные о снижении в крови больных АФП на терминальных стадиях фиброза числа циркулирующих гемопоэтических ($CD45^+/CD34^+$ и $CD133^+$) клеток.

Теоретическое и практическое значение работы. Получены оригинальные знания фундаментального характера о морфофункциональных особенностях крови, ассоциированных со стадиями алкогольного фиброза печени. **Практическая значимость** работы обусловлена новыми данными о связи морфофункциональных показателей крови с развитием патологических изменений в печени, формирующихся на разных стадиях этанол-индуцированного фиброза. Результаты могут быть использованы для разработки и совершенствования малоинвазивных методов диагностики, прогнозирования и/или мониторинга терапевтических мероприятий на разных стадиях алкогольного фиброза печени.

Результаты диссертационной работы применяют в учебном процессе на кафедре фундаментальной медицины медицинского института и Институте Живых Систем БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

Методология и методы исследования:

Высокоинформативные методы исследования были выполнены в научно-исследовательской Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта. В качестве материала исследования использовали венозную кровь, полученную у обследуемых лиц, принявших участие в исследовании (больные алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса, группа сравнения (злоупотребляющие алкоголем без алкогольного фиброза печени) и группа условно здоровых доноров).

Основные методы исследования:

1. Оценка биохимических показателей (*методы биохимического анализа*);
2. Исследование концентрации адипокинов (адипонектина и лептина) в плазме крови (*проточная флуориметрия*).
3. Оценка концентрации компонентов внеклеточного матрикса (TIMP-1, коллаген IV типа, ГК, P-III-NP) и молекул с про- (IL-6, IL-8, TNF α) и противовоспалительным (IL-10, TGF- β 1) действием в сыворотке крови (*иммуноферментный анализ*);
4. Иммунофенотипический анализ лимфоцитов в образцах лизированной венозной крови (проточная цитофлуориметрия);
5. Определение кислородзависимой цитотоксичности моноцитов периферической крови (НСТ-тест);
6. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Алкогольный фиброз печени характеризуется значимым дисбалансом молекул с профиброзным (провоспалительные факторы: IL-6, IL-8, TNF α , лептин и противовоспалительные факторы: TGF- β 1, IL-10) и антифиброгенным (адипонектин) действием, который усугубляется на продвинутых стадиях заболевания.
2. Повышение у больных алкогольным фиброзом печени концентрации молекул внеклеточного матрикса (TIMP-1, коллаген IV типа, ГК), а также активности ферментов печени в сыворотке крови, ассоциированные со стадией фиброза, коррелирует с увеличением содержания эффекторных популяций Т-лимфоцитов памяти, моноцитов, а также регуляторных Т-клеток и увеличением

уровня факторов с про- (IL-6, IL-8, TNF α , лептин) и противовоспалительным действием (TGF- β 1, IL-10) в крови.

3. У больных алкогольным фиброзом печени на терминальных стадиях заболевания значительная лимфопения с изменением состава основных субпопуляций лимфоцитов и снижением в крови числа гемопоэтических стволовых клеток, сопровождается ростом количества эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM} и T_{EMRA}), что может усугублять течение тканедеструктивного процесса.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинико-экспериментального материала, использованием современных высокоинформативных методов (*биохимические методы исследования, иммуноферментный анализ, проточная цитофлуориметрия, НСТ-тест*) и методических подходов, высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на Российской научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 70-летию ФМБА России «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии и иммунофармакологии» (Санкт-Петербург, 2017); Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018); IV-ой научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (иммунодиагностика, иммунопрофилактика, иммунотерапия иммунозависимых и инфекционных болезней) (Крым, 2018 года); II-ой международной конференции «StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины» (Санкт-Петербург, 2018); Балтийском симпозиуме по иммунологии, регенеративной и молекулярной медицине (Калининград, 2018); 3rd International conference & Expo on Obesity and Diet Management & Global summit on Occupational Health & Safety (Amsterdam, Netherlands, 2018); Международной научной конференции «Технические и естественные науки» (Санкт-Петербург, 2019).

В работе приводятся результаты научно-исследовательских работ «Исследование иммунопатологических процессов, приводящих к циррозу печени» (ГК №709); «Исследование молекулярных и клеточных механизмов формирования

хронического воспаления при метаболических нарушениях» (Соглашение № 14.А18.21.0206 от 23 июля 2012 г.); выполненных в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 9 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, и 5 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации.

Диссертация представлена на 139 странице машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 6 рисунками и 15 таблицами. Библиографический указатель включает 313 источника (8 - отечественных и 305 - иностранных).

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Согласно современным представлениям, печень наряду с выполнением метаболических и детоксикационных функций, участвует в регуляции реакций врожденного и адаптивного иммунитета (рисунок 1). Так, в печени обнаруживают большое количество популяций резидентных иммунных клеток (Crispe I. N., 2009; Nemeth E. et al., 2009; Markose D. et al., 2018) и продукцию целого ряда биологически активных молекул: белков острой фазы, компонентов комплемента, цитокинов, хемокинов и др. (таблица, рисунок 1). В состоянии физиологической нормы печень постоянно подвергается нагрузке алиментарными факторами и продуктами бактерий-комменсалов с воспалительным потенциалом (рисунок 2). Непрерывно протекающие метаболические и тканерегенеративные процессы, в сочетании с регулярным воздействием микробных продуктов, приводят к стойкому, строго регулируемому воспалению в здоровом органе, которое необходимо для протекания нормальных физиологических событий, таких как, эмбриональная имплантация (Thouas G.A. et al., 2015), развитие плода (Wang J., Knaut H., 2014), инволюционные послеродовые и тканевые регенеративные механизмы (Leoni G. et al., 2015), гемодинамические изменения, проницаемость капилляров, миграция лейкоцитов в ткани и секреция целого спектра провоспалительных медиаторов и др. (Robinson M.W. et al., 2016). В случае необходимости элиминации гепатотропных патогенов, злокачественных клеток или токсических продуктов метаболической активности, в паренхиме печени происходит активация дополнительных механизмов воспаления (нередко чрезмерных), что неизбежно связано с нарушением тканевого гомеостаза органа и может приводить к прогрессии фиброза с последующим формированием цирроза и печеночной недостаточности (Arroyo V. et al., 2016; Lange C.M., Moreau R., 2018). Т.о., контролируемое воспаление в печени имеет важное значение для поддержания гомеостаза тканей и органов, тогда как дисрегуляция этих механизмов приводит к развитию патологии.

1.11. Иммунологическая структура печени

Печень функционирует как важный буфер между содержимым кишечника и системной циркуляцией - 80% кровоснабжения печени обеспечивается портальной веной. Кровь, поступающая из портальной вены, содержит большое количество безопасных антигенов, полученных из пищи и окружающей среды, а также молекулы из микрофлоры кишечника (Atif M. et al., 2018). Печень, подвергаясь высокой иммуногенной нагрузке, сохраняет при этом, контроль за патогенными инфекциями и злокачественными клетками (Wieland A. et al., 2015; Chu H. et al., 2018; Hou C.T. et al., 2018).

Венозная кровь из портальной вены, попадая в печень, смешивается с оксигенированной кровью из печеночной артерии и стекает через печеночные синусоиды в центральные вены через пластинки гепатоцитов. Синусоиды выстланы специализированными печеночными синусоидальными эндотелиальными клетками (СЭК), которые содержат многочисленные фенестры, обеспечивая движение крови через слой этих клеток к базальным гепатоцитам. Такая структура печени позволяет быстро переносить различные вещества из крови в гепатоциты и способствует удалению и деградации иммуногенных молекул (в частности, бактериального эндотоксина) (Atif M. et al., 2018). Рецепторы распознавания паттернов (pattern-recognition receptors, PRR, РРП), экспрессируемые гепатоцитами и резидентными макрофагами печени (клетки Купфера, КК), связываются с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMPs – pathogen associated molecular patterns), а также с молекулярными фрагментами, ассоциированными с повреждениями (DAMPs - damage-associated molecular patterns), которые присутствуют в больших количествах в крови, поступающей из воротной вены (Takeuchi O., Akira S., 2010; Yu J. et al., 2018). Таким образом, опасные для организма микроорганизмы и эндогенные молекулы фагоцитируются и утилизируются впоследствии гепатоцитами и КК без образования медиаторов воспаления, которые обычно сопровождают РРП-сигнализацию. Этот механизм детоксикации крови, поступающей из кишечника, защищает весь организм от чрезмерной иммунной активации и формирует уникальную иммунологическую среду в печени.

Т.о., порталный кровоток низкого давления, фенестрированный эндотелий и отсутствие базальной мембраны облегчают взаимодействия между резидентными иммунными клетками и негемопоэтическими клетками печени (Robinson M.W. et al., 2016). Резидентные иммунные клетки базируются в синусоидах печени и субэндотелиальных пространствах Диссе, где происходит образование лимфы, попадающей затем в лимфатические сосуды вдоль порталного тракта. Популяция этих клеток включает в себя антиген-презентирующие (АПК), миелоидные клетки, а также лимфоидные клетки врожденного и адаптивного иммунитета (Norris S. et al., 1998; Kelly A. et al., 2014; Robinson M.W. et al., 2016). Несмотря на то, что некоторые популяции резидентных иммунных клеток печени хорошо изучены, их полный спектр до сих пор не выяснен.

1.1.1. Миелоидные популяции клеток печени

Макрофаги или КК составляют до 90% от общей численности резидентных макрофагов в организме, образуя почти 1/3 непаренхимальных клеток в печени (Bilzer M. et al., 2006; MacParland S.A. et al., 2018) (рисунок 1). КК в большом количестве экспрессируют рецепторы распознавания паттернов, комплемента и Fc-рецепторы, что обеспечивает им высокую фагоцитарную активность и способность к продукции цитокинов с провоспалительным спектром действия (Su G. L. et al., 2000; van Egmond M. et al., 2000). КК играют важную роль в иммунной регуляции, репарации и регенерации паренхимы печени (Elsegood C.L. et al., 2015), а также обладают способностью реагировать на различные медиаторы, взаимодействовать с толл-подобными рецепторами (Toll-like receptor, TLR), RIG-I (RIG-I-like receptors, RLR)-подобными и NOD (Nod-like-receptor, NLR)-подобными рецепторами (Miura K. et al., 2013).

В здоровой печени представлены также популяции дендритных клеток (ДК): миелоидные и плазмоцитоидные. ДК печени описываются как фенотипически незрелые; однако в некоторых случаях ДК могут стимулировать сильные реакции Т-клеток (Thomson A.W., Knolle P.A., 2010). Относительно недавно было показано, что субпопуляция человеческих ДК в печени (CD141+) является мощным продуцентом цитокинов и активатором Т-клеток (Kelly A., 2014).

В здоровой печени также присутствуют миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC, МлСК) (Chen S. et al., 2011), их количество возрастает при хронических заболеваниях печени (Pallett L.J., 2015). МлСК обладают способностью подавлять активацию Т-лимфоцитов за счет продукции IL-10, трансформирующего фактора роста (TGF) β и аргиназы (Gabrilovich D.I., 2009). Гранулоцитарные клетки, в частности нейтрофилы, как правило, отсутствуют в ткани здоровой печени; их обнаруживают только в ответ на инфекцию и воспаление (Markose D. et al., 2018). Нейтрофилы и их предшественники имеют несколько общих фенотипических маркеров с МлСК.

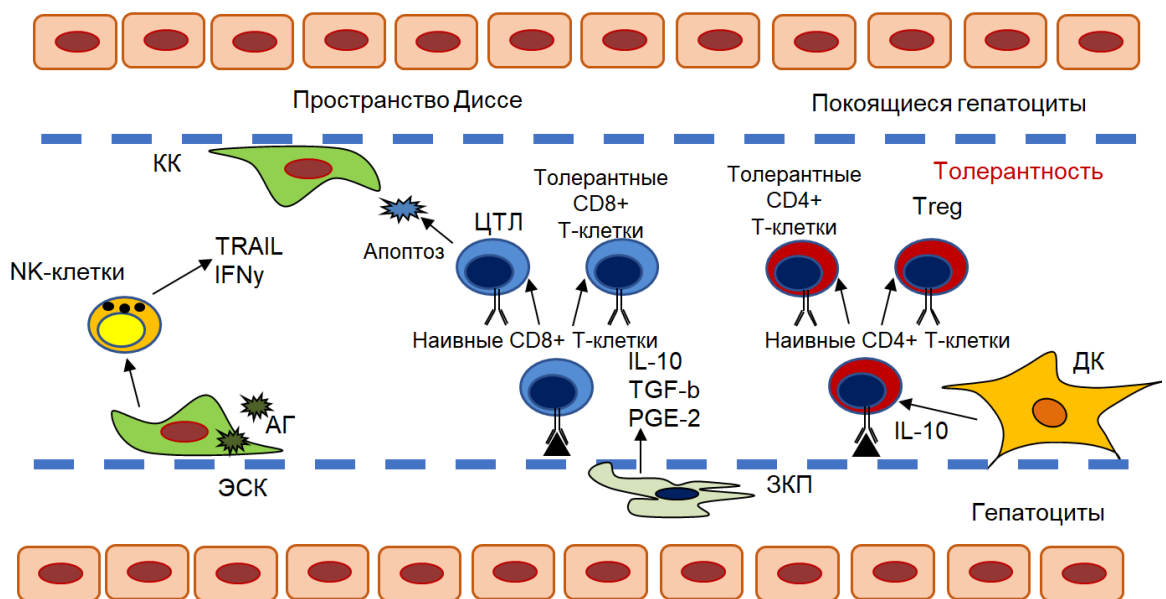


Рисунок 1. Иммунная регуляция локального гомеостаза в печени – норма (адаптировано из Markose D. et al., 2018). *Пояснение.* В норме большая часть паренхимы печени представлена покоеющимися гепатоцитами. Непаренхиматозные клетки находятся в синусоидах, за исключением ЗКП (в пространстве Диссе). Антигенпрезентирующие клетки (КК, СЭК, ДК) располагаясь внутри синусоидов, удаляют антигены из кровообращения путем фагоцитоза. Патогены активируют также другие клетки врожденного иммунитета (NK-клетки). СЭК, взаимодействуя с Т-клетками, способствуют генерации толерантных Т-клеток и инициируют апоптоз активированных Т-лимфоцитов. Медиаторы (IL-10, TGF β и PGE2), секретируемые АПК также способствуют развитию толерантности печени.

Сокращения: здесь и на рисунке 2. **КК**- клетки Купфера, **СЭК** – синусоидальные эндотелиальные клетки, **ДК** – дендритные клетки, **ЗКП** – звездчатые клетки.

1.1.2. Лимфоидные иммунные клетки печени

Согласно современным представлениям, печень в условиях физиологической нормы, рассматривается в качестве иммунного органа, обогащенного клетками врожденного (т.к. КК, $\gamma\delta$ 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 (Kenna T. et al., 2003; Kenna T. et al., 2004; Dusseaux M. et al., 2011; Kurioka A. et al., 2016; Hunter S. et al., 2018) (рисунок 1).

Расположенные в печени популяции лимфоцитов врожденного звена иммунитета являются мощными продуцентами различных медиаторов, оказывая влияние на врожденные и адаптивные иммунные реакции (рисунок 1). Репертуар этих клеток сильно отличается у человека и животных. Так, у мышей NKT- и NK-клетки составляют до 40% и 10% от общего количества лимфоцитов печени соответственно, тогда как в человеческом организме, напротив, преобладают NK-клетки (Gao B. et al., 2008; Robinson M.W. et al., 2016).

У людей $CD56^{\text{bright}}$ NK-клетки составляют более 50% от общего количества печеночных NK-популяций по сравнению с 10-15% в периферической крови (Robinson M.W. et al., 2016). У мышей инвариантные NKT-клетки попадают в печень, преимущественно, через связывание лимфоцитарного функционального антигена (Lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1) с молекулой межклеточной адгезии 1 типа (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1) и образуют тканерезидентную популяцию иммунных клеток (Lync L. et al., 2015).

В здоровой печени также встречаются клетки, отвечающие за формирование адаптивного иммунитета. Наиболее распространены популяции цитотоксических $CD8$ Т-клеток, активированных Т-клеток и Т-клеток памяти (Norris S. et al., 1998). Накопление этих субпопуляций Т-лимфоцитов ассоциировано с их апоптозом и секвестрацией в печени, в связи, с чем печень рассматривают в качестве органа - «утилизатора» Т-лимфоцитов (Robinson M.W. et al., 2016). В-клетки составляют до 8% от общей популяции лимфоцитов в печени человека (Norris S. et al., 1998). Субпопуляции В-клеток, в частности $CD5^+$, увеличиваются при гепатотропной вирусной инфекции (Racanelli V. et al., 2001; Curry M.P. et al., 2003).

1.1.3. Гемопоэтические клетки-предшественницы печени

Классически, у здоровых людей процесс развития гемопоэтических клеток ограничен в костном мозге. Была выдвинута гипотеза, что некоторые популяции иммунных клеток дифференцируются локально в печени (Golden-Mason L. et al., 2000; Robinson M.W. et al., 2016). Гемопоэтические клетки-предшественницы печени донора восстанавливают популяции иммунных клеток после летального облучения у мышей (Jiang X. et al., 2013). Печень взрослого человека также содержит популяции клеток-предшественниц, которые экспрессируют поверхностные маркеры, характерные для незрелых кроветворных клеток и образуют *in vitro* мультилинейные гемопоэтические колонии (Golden-Mason L. et al., 2000). Эти миелоидные и лимфоидные популяции-предшественницы могут способствовать развитию фенотипически различных популяций иммунных клеток в печени через механизмы локальной дифференцировки (Robinson M.W. et al., 2016). После трансплантации печени имеет место химеризм, при котором гемопоэтические стволовые клетки реципиента поступают в донорскую печень, где могут дифференцироваться также в эндотелиальные клетки и гепатоциты (Carbone M., Neuberger J.M., 2014).

1.1.4. Роль негемопоэтических клеток печени в иммунорегуляции

Наряду с иммунными клетками печени, ключевую роль в формировании местного и системного врожденного иммунитета играют негемопоэтические клетки, такие как - гепатоциты, СЭК и звездчатые (клетки Ито, ЗКП) клетки, для которых характерна экспрессия широкого диапазона PPP (Seki E., Brenner D., 2008) (рисунок 2). Экспрессия этими клетками TLR и молекул к гликопротеину обеспечивает связывание и клиренс портальной крови от PAMPs и регулирует продукцию воспалительных медиаторов (Robinson M.W. et al., 2016). Гепатоциты экспрессируют также молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса и способны представлять антигены классическим Т-клеткам (Crispe I.N., 2009; Thomson A.W., Knolle P.A., 2010). В результате такого взаимодействия, Т-клетки образуют популяции функциональных Т-эффекторных лимфоцитов в отсутствие CD4 Т-клеточной активации и увеличивают иммуногенность патогенов (Böttcher J.P. et al., 2013). Экспрессия CD1d - дифференцировочных молекул гепатоцитами

мышь обеспечивает представление липидных антигенных компонентов инвариантным NKT-клеткам (Yang L. et al., 2007). У человека экспрессия молекул CD1d на здоровых гепатоцитах не обнаружена и появляется только в ответ на инвазию вирусами гепатита (Yanagisawa K. et al., 2013).

1.2. Роль микроокружения печени в иммунорегуляции

Анатомическая структура печени, ее резидентный иммунный репертуар и состояние постоянной стимуляции патогенами способствуют созданию в этом органе уникальной цитокиновой среды, 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 TGF β) цитокинов/факторов роста (Golden-Mason L. et al., 2004; Kelly A.M. et al., 2006; Tu Z. et al., 2007). Сформированное микроокружение определяет баланс между иммунной толерантностью и реакциями воспаления в здоровой печени. Как уже упоминалось ранее, существенный вклад в формирование уникального микроокружения печени вносят особенности ее кровоснабжения (Wilson G.K. et al., 2014). Кроме того, не- и гемопоэтические клетки печени постоянно получают сигналы от алиментарных и комменсальных молекул, что вызывает состояние толерантности (Robinson M.W. et al., 2016).

На состояние цитокиновой среды в печени влияют также высокие уровни жиров и углеводов, поступающих в кровоток из пищи. Углеводы поглощаются гепатоцитами и депонируются в виде гликогена, в то время как жиры, переносимые из кишечника в виде хиломикронов, преобразуются в ряд липопротеинов. Последние распределяют холестерин и триглицериды по всему организму. Важно отметить, что метаболические реакции в печени тесно связаны с процессами воспаления (Tannahill G.M. et al., 2013). В частности, триглицериды и холестерин способствуют передаче TLR-сигналов и активации воспаления (Tall A.R., Yvan-Charvet L., 2015). Так, в результате метаболической регуляции воспаления при неалкогольной жировой болезни печени регистрируются повышенные уровни провоспалительных цитокинов, которые способствуют развитию фиброза печени (Вульф М.А. и др. 2018; Tilg H., Moschen A.R., 2010). Провоспалительный профиль на мышинных моделях может быть воспроизведен с помощью диеты с высоким

содержанием жиров; частично, этот эффект обусловлен сенсibilизацией гепатоцитов к агонистам TLR – насыщенным жирным кислотам (Csak T. et al., 2011). Метаболические изменения в инфицированных гепатоцитах при вирусных гепатитах В и С способствуют репликации вируса (Bar-Yishay I. et al., 2011; Filipe A., McLauchlan J., 2015). Макрофаги и ДК подвергаются метаболическому перепрограммированию при активации антигенами, переходя с окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз, т.н. эффект Варбурга, который способствует синтезу этими клетками провоспалительных медиаторов (O'Neill L.A.J., Pearce E.J., 2015). При нормоксии переход к аэробному гликолизу в макрофагах приводит к увеличению уровней сукцината, что в свою очередь, активирует продукцию фактора транскрипции HIF1 α (фактор, индуцируемый гипоксией 1 α) и IL-1 β (Tannahill G.M. et al., 2013). Несмотря на гипоксию, характерную для печеночного кровотока, в здоровой печени гипоксический ответ не индуцируется (Wilson G.K. et al., 2014), что свидетельствует об уникальном ответе клеток печени на провоспалительные метаболические сигналы. Более глубокое понимание роли *динамического микроокружения* печени в поддержании нормального гомеостаза необходимо для интерпретации и оценки спектра изменений при формировании патологии печени.

1.3. Воспалительные процессы в здоровой печени.

Иммунная толерантность печени

Воспаление и провоспалительные медиаторы, индуцируемые резидентными иммунными клетками и негемопоэтическими клетками печени, играют важную роль в поддержании местного и системного гомеостаза у здоровых людей (рисунок 2). Здоровая печень часто описывается как иммунологически толерантная (Protzer U. et al., 2012; Crispe I.N., 2014; Markose D. et al., 2018). Однако способность этого органа к быстрым и эффективным иммунным реакциям очевидна. Понятие о том, что печень является иммунологически толерантным органом, возникло в трансплантологии, когда впервые было обнаружено, что аллогенная трансплантация печени у свиней значительно лучше переносится, чем трансплантация других органов (Calne R.Y. et al., 1969). В частности, эта концепция подтверждается тем фактом, что реципиенты после трансплантации

печени не нуждаются в высоком уровне иммуносупрессии (Lerut J., Sanchez-Fueyo A., 2006; Simpson N., et al., 2006).

Поддержанию толерантности печени способствуют резидентные миелоидные клетки. Так, КК под воздействием бактериальных эндотоксинов, продуцируют противовоспалительные цитокины, включая IL-10 и простагландины (Markose D. et al., 2018). Повышение уровня IL-10 ингибирует экспрессию ко-стимулирующих молекул на АПК, предотвращая активацию CD4 Т-лимфоцитов, ограничивая тем самым адаптивный иммунный ответ (Robinson M.W. et al., 2016; Markose D. et al., 2018). Презентация антигенных молекул КК способствует увеличению популяции Т-регуляторных клеток (Treg), обеспечивающих антиген-специфическую толерантность также за счет продукции IL-10 (Heymann F., et al., 2015). Миелоидные ДК печени менее эффективно активируют Т-лимфоциты и продуцируют значительно больше IL-10 по сравнению с аналогичными клетками селезенки (Goddard S. et al., 2004; De Creus A. et al., 2005; Vamboat Z.M. et al., 2009). Печеночные плазмцитоподобные ДК фенотипически незрелые и не являются эффективными активаторами Т-клеток *ex vivo*, однако способны к эффективному представлению антигена после созревания, индуцированного факторами роста или агонистами TLR (Kingham T.P. et al., 2007). Также показано, что плазмцитоподобные ДК печени способны к синтезу IL-10 и активации Treg лимфоцитов (Tokita D. et al., 2008). В дополнение к этим специфичным антиген-презентирующим популяциям, СЭК и гепатоциты также обладают способностью самостоятельно представлять антигены Т-лимфоцитам (Thomson A.W., Knolle P.A., 2010). В определенных условиях антиген-презентирующую функцию могут выполнять и ЗК, выступая в роли вспомогательных «клеток-наблюдателей» (Ichikawa S. et al., 2011). Презентация антигенов в печени, в отсутствие ко-стимулирующих молекул и без содействия CD4 Т-лимфоцитов, способствует формированию толерантности Т-клеток, препятствуя их эффективной дифференцировке (Bowen D.S. et al., 2004; Wuensch S.A. et al., 2010). Толерогенная среда печени также поддерживается регуляторными миелоидными популяциями, в частности, МлСК (Sander L.E. et al., 2010; Zimmermann H.M. et al., 2015). Последние опосредуют свою активность посредством продукции иммуносупрессивных цитокинов, т.к. IL-10 и TGF β , а также синтеза аргиназы и фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO),

ограничивая тем самым, доступ иммунных клеток к незаменимым аминокислотам, необходимых им для процессов активации и пролиферации (Gabrilovich D.I., 2009).

1.4. Системный гомеостаз и фаза острого ответа

Ключевой системной функцией печени является синтез сывороточных белков, включая белки комплемента, альбумин, фибриноген, факторы свертывания крови, транспортные белки, ингибиторы протеазы и липопротеины (таблица 1), которые участвуют в системном транспорте питательных веществ, в регуляции осмотического давления крови и действуют как неактивные предшественники нескольких врожденных иммунных медиаторов.

Печень также играет центральную роль в обнаружении и формировании реакции на воспалительные сигналы с любых участков тела. На ранних стадиях внепеченочного воспаления цитокины, продуцируемые иммунными клетками, поступают в кровоток и активируют гепатоциты, которые впоследствии инициируют системный острофазный ответ (Markose D. et al., 2018; Sá-Pereira I. et al., 2018). Гепатоциты увеличивают продукцию белков острой фазы, а также синтезируют ИЛ-6, который на системном уровне усиливает воспалительные реакции. Острофазные белки (БОФ), продуцируемые гепатоцитами, имеют прямую эффекторную функцию (таблица) и отвечают за формирование системного воспаления, которое способствует обезвреживанию патогенов (Zhou Z. et al., 2015; Lindquist J.A. et al., 2018). Кроме того, БОФ запускают целый ряд механизмов в макроорганизме. В частности, воздействуя на костный мозг, обеспечивают развитие лейкоцитоза; через центральные механизмы - повышение температуры тела, а также способствуют массивной инфильтрации иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления (Lindquist J.A. et al., 2018). В то же время острофазная реакция включает ряд механизмов для ограничения чрезмерного воспаления, в т.ч. снижение активности нейтрофилов ингибиторами протеазы, такими как α 2-макроглобулин, подавление С-реактивным белком продукции TNF- α макрофагами (Inatsu A. et al., 2009), рекрутирование МлСК посредством сывороточного амилоида А (Sander L.E. et al., 2010).

Таблица 1. Синтез белков острой фазы в печени

Белки, индуцированные в фазу острого ответа	Примеры	Функции
Белки комплемента	Компоненты комплемента - C3, C4 и C9	Усиление фагоцитоза, регуляция хемотаксиса лейкоцитов, индукция дегрануляции клеток, повышение проницаемости сосудов и лизис бактериальных клеток
Железосвязывающие белки	Гаптоглобин, гемопексин, ферритин и гепсидин	Уменьшение свободного железа в сыворотке; антимикробные функции
Антимикробные белки	Антимикробный пептид 2, гепсидин	Антимикробная активность
Факторы свертывания крови	Фибриноген, протромбин, фактор VIII, фактор IX и фактор Виллебранда	Коагуляция крови
Провоспалительные белки	IL-6, липополисахарид (LSP)- связывающий белок, фосфолипаза A ₂	Усиление провоспалительных сигналов и усиление острофазного ответа
Лектины, пентаксины, фиколины и коллектины	C-реактивный белок, маннозосвязывающий лектин (МСЛ), коллектин печени 1 (CL-L1), фиколин-2 и сывороточный амилоид P(SAP)	Активация и усиление фагоцитоза
Ингибиторы протеаз	α_2 -Макроглобулин, α_1 -антихимотрипсин и α_1 -антитрипсин	Противовоспалительные функции через ингибирование коагуляции, нейтрофилов и тучных клеток

Безусловно, эти процессы необходимы для ограничения повреждения тканей, вызванного воспалительным процессом и запуска репаративного процесса.

1.5. Иммуитет печени и процессы фиброгенеза/фибролиза

Как уже упоминалось ранее, при сохранении общей толерогенной среды, иммунная система печени должна быстро реагировать на опухолевые клетки и патогенные микроорганизмы. Некоторые патогены, включая несколько видов вирусов, бактерий и паразитов, являются гепатотропными (Protzer U. et al., 2012), для борьбы с которыми необходим эффективный местный иммунитет. Во время острого поражения печени, активированные КК становятся мощными

продуцентами цитокинов / хемокинов, таких как IL-1, IL-6, TNF- α , MIP-1 α и RANTES и др. (Mosher B. et al., 2001; Gregory S.H., Wing E.J., 2002; Tacke F. et al., 2009). Этот провоспалительный ответ индуцируется после передачи сигналов через TLR (в частности, TLR3), независимые от MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene (88)) (Tu Z. et al., 2008). В здоровой печени взрослого индивидуума есть также мощные провоспалительные CD141⁺ миелоидные ДК, способные индуцировать продукцию IFN- γ и IL-17 Т-клетками (Kelly A. et al., 2014).

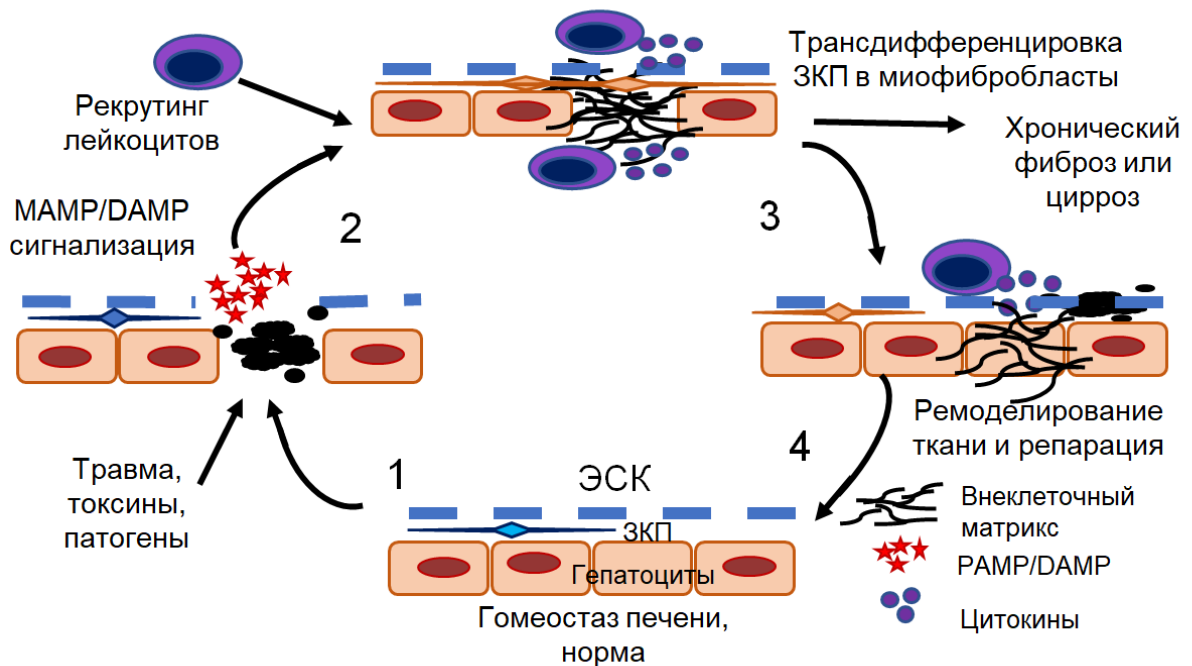


Рисунок 2. Локальный гомеостаз в печени в ответ на повреждение (адаптировано из Robinson M.W. et al., 2016). *Пояснение:* (1) При острой травме, гибели клеток или инфекции апоптотические гепатоциты высвобождают множество DAMPs и/или RAMPs, которые распознаются соседними гепатоцитами, ЗКП и популяциями резидентных иммунных клеток; активация клеток; (2) Активированные клетки секретируют воспалительные медиаторы, опосредующие рекрутинг лейкоцитов и трансдифференцировку ЗКП в миофибробласты. Последние инициируют фиброз посредством синтеза компонентов внеклеточного матрикса; (3) Воспаление способствует экспрессии факторов фибролиза лейкоцитами и апоптозу миофибробластов; (4) Регенерация поврежденной ткани печени, восстановление гомеостаза. Отсутствие фазы ремоделирования и репарации печени способствует тому, что постоянное воспаление приводит к прогрессирующему развитию фиброза печени и возможному циррозу.

Последние, при наличии воспалительной среды в печени, могут дифференцироваться в популяции функциональных Т-эффекторных клеток, способных к элиминации патогенов даже в отсутствие классической поддержки

CD4 T-лимфоцитов (Böttcher J.P. et al., 2013). Реакции острого воспаления в печени приводят к рекрутингу и активации популяций лейкоцитов, а также способствуют индукции фиброзных реакций в очаге повреждения (Pellicoro A. et al., 2014; Vaesk S., Taske F., 2014) (рисунок 2). Фиброгенез, выявляемый при острой травме, оказывает протекторное действие в отношении выживших гепатоцитов, путем снижения проапоптотической передачи сигналов и повышения устойчивости к ряду токсинов (Bourbonnais E. et al., 2012).

Этот процесс регулируется воспалительными цитокинами и факторами роста, продуцируемыми лейкоцитами, которые мигрируют в поврежденную ткань. TNF α , IL-6, фактор роста тромбоцитов (Platelet-derived growth factor, PDGF) и TGF- β приводят к активации и пролиферации ЗКП, которые являются активными продуцентами компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), включая α -гладкомышечный актин и коллаген I типа, тканевой ингибитор матричной металлопротеиназы-1 (TIMP-1), коллагена IV типа, гиалуроновая кислота, N-минальный пептид III типа (Chae M.S. et al., 2018). Фиброз печени - патологический процесс, однако он необходим для восстановления гомеостаза тканей после их повреждения (рисунок 3). Фиброз становится клинически значимым, когда он изменяет структуру и функцию ткани из-за нарушения регуляции или чрезмерного воспаления. Для фиброгенеза, индуцированного большинством гепатотоксических факторов, характерна цикличность процессов повреждения/репарации гепатоцитов (Thouas A.G. et al., 2015). В фазе репарации/прекращения острого фиброза печени, КК продуцируют ряд противовоспалительных медиаторов, которые увеличивают экспрессию матричных металлопротеиназ и подавляют синтез их ингибиторов (Thouas A.G. et al., 2015), а цитотоксическое действие НК-клеток, направленное на ЗКП, способствует регуляции внутрипеченочного фиброза. Трансдифференцировка активированных ЗКП в миофибробласты изменяет баланс активирующих и ингибирующих лигандов клеточных рецепторов, что приводит к их делеции посредством НК-клеток через TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), NKG2D (natural killer group 2D) и FasL - зависимые механизмы (Radaeva S. et al., 2006; Glässner A. et al., 2012). Многогранные взаимодействия субпопуляций иммунных клеток, регулирующие процессы репарации печени, приводят к

рассмотрению ее роли в качестве важного компонента врожденного иммунного ответа на повреждение тканей.

1.6. Воспаление и регенерация печени

Способность печени полностью или частично восстанавливаться после травмы необходима для поддержания основных функций органа при контроле метаболизма и ксенобиотической детоксикации. Эта регенеративная способность печени обусловлена пролиферацией зрелых гепатоцитов в ответ на различные экологические сигналы (Malato Y. et al., 2011; Hou C.T. et al., 2018). Регенерационный потенциал печени обусловлен медиаторами воспаления (т.к. IL-1 α , TNF α и IL-6), факторами роста (фактор роста гепатоцитов и фактор эпидермального роста) и резидентными популяциями иммунных клеток (Selzner N. et al., 2003; Michalopoulos G.K., 2007; Chae M.S. et al., 2018). Так, у мышей с низким уровнем IL-6 нарушена регенерация печени и снижена пролиферация гепатоцитов; эти дефекты устраняются сразу после введения IL-6 (Cressman D.E. et al., 1996). Ослабление регенеративной функции печени наблюдается также у мышей, получавших антитела против TNF α . Прорегенерационный эффект TNF α требует экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота, которая блокирует потенциальный проапоптотический сигналинг TNF α (Rai R.M. et al., 1998). Активация КК обусловлена рекрутингом нейтрофилов в печень в ответ на воспалительные сигналы, через ICAM-1-зависимый путь. Белки комплемента - C3 и C5 также играют важную роль в прайминге КК и способствуют пролиферации гепатоцитов после частичной гепатэктомии (Strey C.W. et al., 2003). Резидентные иммунные клетки могут также проявлять ингибирующий эффект на процессы регенерации печени (Gao B. et al., 2009). Так, снижение активности НК-клеток способствует усилению регенерации печени за счет уменьшения продукции IFN γ , который ингибирует клеточный цикл гепатоцитов и их пролиферацию (Shen Z., 2008). Истощение НКТ-клеток у трансгенных мышей, инфицированных вирусом гепатита В, также усиливает регенерацию печени из-за снижения продукции IFN γ и TNF α (Dong Z. et al., 2007). Эти популяции резидентных иммунных клеток действуют по принципу отрицательной обратной связи, регулируя регенерацию печени и восстанавливая ее гомеостаз.

Как уже упоминалось ранее, реакции воспаления в паренхиме печени являются важным аспектом функционирования здорового органа, тогда как процессы фиброзирование необходимы для восстановления ее нормального гомеостаза в результате повреждения (Robinson M.W. et al., 2016). При длительной (хронической) активации механизмов врожденного иммунитета под действием различных факторов: хронической инфекции, повреждения тканей, избыточного потребления алкоголя или жирной пищи, роста опухоли и др., происходит формирование патологического (чрезмерного) воспаления, прогрессирование фиброза печени до цирроза, что опосредует, в целом, нарушение функций и архитектоники органа (Brenner C. et al., 2013; Li S. et al., 2016).

1.7. Краткая характеристика действия этанола. Метаболизм этанола

Метаболизм этанола в желудке и печени осуществляется алкогольдегидрогеназой (АДГ) и цитохромом P450 2E1 (CYP2E1 – относится к классу ферментов, которые в значительной степени ответственны за распад чужеродных соединений у млекопитающих) (Zakhari S., 2006; Chan L.N. et al., 2014). АДГ присутствует в цитозоле, тогда как CYP2E1, преимущественно локализован в митохондриях. Оба фермента превращают спирт в ацетальдегид, который далее метаболизируется в ацетат ацетальдегиддегидрогеназой (АЛДГ) в митохондриях. Ацетат затем высвобождается в кровь, где он окисляется до углекислого газа в сердечной и скелетных мышцах, а также в головном мозге (Chan L.N. et al., 2014). Ацетальдегид является токсичным побочным продуктом, который способствует повреждению тканей и формированию алкогольной зависимости (Lind P.A. et al., 2012). Связываясь с другими белками, ацетальдегид образует аддукты, играющие ключевую роль в развитии повреждения печени, такие как малондиальдегид и малондиальдегид-ацетальдегид (Ströhle A. et al., 2012). Последний стимулирует антительные реакции, потенцирующие процессы воспаления в печени и фиброз (Tuma D.J. et al., 2003). Кроме того, окисление этанола CYP2E1 приводит к образованию активных форм кислорода (АФК, ROS, Reactive oxygen species).

Повышенные уровни АФК опосредуют развитие окислительного стресса, который участвует в патогенезе многих заболеваний: опухолевых, атеросклероза, диабета и т.д. (Tuma D.J. et al., 2003; Sapkota M. et al., 2003). CYP2E1 и каталаза также могут метаболизировать алкоголь в головном мозге. Каталаза локализуется в пероксисомах и при участии перекиси водорода приводит к окислению спирта в воду и ацетальдегид. Процессы алкогольного обмена могут протекать и в поджелудочной железе при участии ацинарных и панкреатических звездчатых клеток, что способствует развитию алкогольного панкреатита (Ren Z. et al., 2003). Кроме того, следует учитывать высокую калорийность алкогольных напитков, которые часто становятся основным источником энергии у страдающих алкоголизмом, что нередко приводит к недоеданию. Среди этой когорты лиц часто наблюдается недостаток одного или нескольких основных витаминов, включая витамины А, С, D, Е, фолата и тиамин (Freeman W.M. et al., 2011; Carter R.C. et al., 2017). Общеизвестно, что эти микроэлементы играют важную роль в гомеостазе иммунной системы и реагировании на инфекцию.

Согласно данным научной периодики, употребление алкоголя оказывает влияние на все органы и ткани у людей и животных (Barr T. et al., 2016). В нескольких исследованиях описана J-образная кривая воздействия алкоголя на здоровье человека. Мало и умеренно употребляющие алкоголь имеют более низкий риск смертности от всех причин, чем совсем не употребляющие; тогда как злоупотребляющие алкоголем подвержены наибольшему риску (O'Keefe J.H. et al., 2007).

Интересными являются сведения, свидетельствующие, что умеренное употребление алкоголя связано с уменьшением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (Holmes M.V. et al., 2014), а также обладает иммуномодулирующим эффектом; тогда как чрезмерный прием алкоголя приводит к увеличению риска развития цирроза печени, гипертонии, инсульта, диабета 2 типа, опухолевых заболеваний, дисрегуляции иммунных функций и др. (Jimenez V.A. et al., 2017).

1.8. Краткие сведения об алкогольной болезни печени

Алкогольная болезнь печени (АБП) объединяет различные по тяжести функциональные и структурные нарушения печени, вызванные систематическим приемом алкогольных напитков. Выделяют следующие формы АБП: алкогольная жировая инфильтрация печени (алкогольный стеатоз печени), алкогольный фиброз печени, алкогольный острый гепатит, хронический алкогольный гепатит, алкогольный цирроз печени (Винницкая Е.В., Киселева А.В., 2014). Около 30% людей во всем мире, в избытке употребляющих алкоголь, имеют значительный риск развития алкогольной болезни печени (АБП) (Lucey M. R. et al., 2009; O'Shea R. S. et al., 2010), которая приобретает хроническое течение и прогрессирует в случае дальнейшего потребления алкоголя (Gao B., Bataller R., 2011), являясь основной причиной печёночной недостаточности. АБП часто сочетается со стеатозом, последующим присоединением воспаления и фиброза. Цирроз возникает примерно в 2% случаев, возможно также развитие рака печени (Schwartz J.M., Reinus J.F., 2012; Orman E.S. et al., 2013). Алкогольный гепатит – манифестация АБП, которая может сочетаться с жировым перерождением печени (стеатогепатит), способен возникнуть на любой стадии заболевания и повышает риск развития цирроза (Lucey M. R. et al., 2009; Nagy L.E., 2015).

Первая стадия АБП, стеатоз, включает ряд процессов. Алкоголь, образуя избыток промежуточных метаболитов никотинамидадениндинуклеотида в восстановленной форме (NADH), стимулирует избыточный синтез жирных кислот в печени (Lieber C.S., 2004). Существуют доказательства тесных взаимодействий метаболических и иммунных механизмов в начальной стадии АБП, имеющих мультифакторную природу (Mandrekar P., 2011). При исключении алкоголя из рациона и отсутствия сопутствующей патологии (например, ожирения), стеатоз обратим. Однако, при переходе стеатоза в стеатогепатит, происходит тяжелое повреждение печени, лечение которого недостаточно эффективно. Хроническое потребление алкоголя также вызывает фиброз, характеризующийся активным образованием внеклеточных матриксных белков, в частности – коллагена (Hernandez-Gea V., Friedman S. L., 2011). Около 10-20% пациентов с фиброзом, продолжающих активное употребление алкоголя, приходят к финальной стадии АБП – циррозу (Orman E. S. et al., 2013). Последний характеризуется тотальным

повреждением печени, включая фиброзную деформацию паренхимы и сосудов, некроз клеток печени. Основной чертой цирроза является образование узлов регенерации различного размера, замещающих потерю ткани, вызывающих сдавление и обструкцию кровеносных сосудов, что приводит к портальной гипертензии. Выход в межклеточное пространство дебриса некротизированных гепатоцитов, потеря способности печени к разрушению микробных и других провоспалительных метаболитов, ведёт к хронической стимуляции врожденного иммунитета. Цирроз характеризуется плохим прогнозом: средняя выживаемость составляет 10 лет; при циррозе рак печени возникает в 2% случаев (Orman E. S. et al., 2013).

Как уже упоминалось ранее, патогенез АБП связан с действием этанола на процессы фиброгенеза через механизмы врожденного и адаптивного иммунитета (Laso F.J. et al., 2010; Barr T. et al., 2016), где важную роль играют провоспалительные реакции (Gazatova N.D. et al., 2018).

1.9. Влияние алкоголя на врожденный иммунитет

Индукцированная алкоголем активация механизмов врождённого иммунитета в печени является основным фактором развития АБП, опосредуя развитие расстройств от локализованного и острого воспаления до масштабного повреждения печёночной паренхимы (Cohen J.I., Nady L.E., 2011; Gao B. et al., 2011; Seki E., Schanabl B., 2012; Wang H.J. et al., 2012; Orman E.S. et al., 2013).

Этанол, в зависимости от дозы и продолжительности приёма, обладает способностью модулировать функции моноцитов, незрелых клеток врожденного иммунитета, циркулирующих в крови до тех пор, пока они не мигрируют в ткани (Neupane S.P., 2016) (рисунки 3, 4). Моноциты экспрессируют Toll-подобный рецептор (TLR-4), ответственный за распознавание эндотоксина (липополисахарида, ЛПС) на поверхности грамотрицательных бактерий. При связывании с бактериальным ЛПС, моноциты активируются, созревают в макрофаги и мигрируют в ткани, где они реагируют на патоген, секретировав различные факторы/медиаторы, а также рекрутируя дополнительные иммунные клетки посредством продукции хемокинов и представления пептидов патогенов Т-клеткам для их активации (Vidya M.K., 2017). Эти события опосредованы

активацией ядерного фактора карра В (NFκB), гетеродимеризацией его субъединиц p50-p65, с последующей транслокацией этого фактора в ядро, что приводит к продукции провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины – IL-1β, IL-6, IL-12 и фактор некроза опухоли TNFα (Бурганова Г.Р. и др., 2008; Janeway С., 2017).

Некоторые исследования продемонстрировали дозозависимое действие алкоголя на реакцию моноцитов/макрофагов на ЛПС (рисунок 3). Так, предварительная *in vitro* инкубация моноцитов (полученных от здоровых доноров) с этанолом (25 ммоль, что соответствует концентрации алкоголя в крови ~ 0,1 г/дл) в течение 24 ч. ингибировала ЛПС-опосредованную ядерную транслокацию NFκB, и, как следствие, продукция провоспалительных цитокинов снижалась (Mandrekar P. et al., 2009). Другими авторами были получены аналогичные результаты. Так, при воздействии этанола (25 мМ) на линию макрофагов RAW264,7 и культуры моноцитов крови человека в течение 24 ч. с последующей стимуляцией ЛПС, отмечалось снижение продукции TNF-α за счет увеличения экспрессии IL-1R-ассоциированной киназы моноцитов (IRAK-M), негативного регулятора ЛПС-сигналинга (Mandrekar P. et al., 2009).

Культивирование моноцитарной клеточной линии Mono-Mac-6 в присутствии этанола (25-75 мМ) в течение 24 ч. также дозозависимым образом ингибировало ЛПС- и форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА)-опосредованную продукцию TNF-α (Zhang Z. et al., 2001). Ингибирующее действие этанола на активность NFκB, в частности, связано с повышенной протеолитической деградацией IκBα киназы (IKK) и последующим уменьшением фосфорилирования p65 субъединицы NFκB (Mandrekar P. et al., 2007).

Показано, что воздействие этанола (25 мМ) на макрофаги RAW 264,7 и моноциты периферической крови человека в течение 60 мин. приводило к активации фактора транскрипции теплового шока-1 (HSF-1), который, в свою очередь, индуцирует экспрессию белка теплового шока Hsp70 (Mandrekar P. et al., 2008).

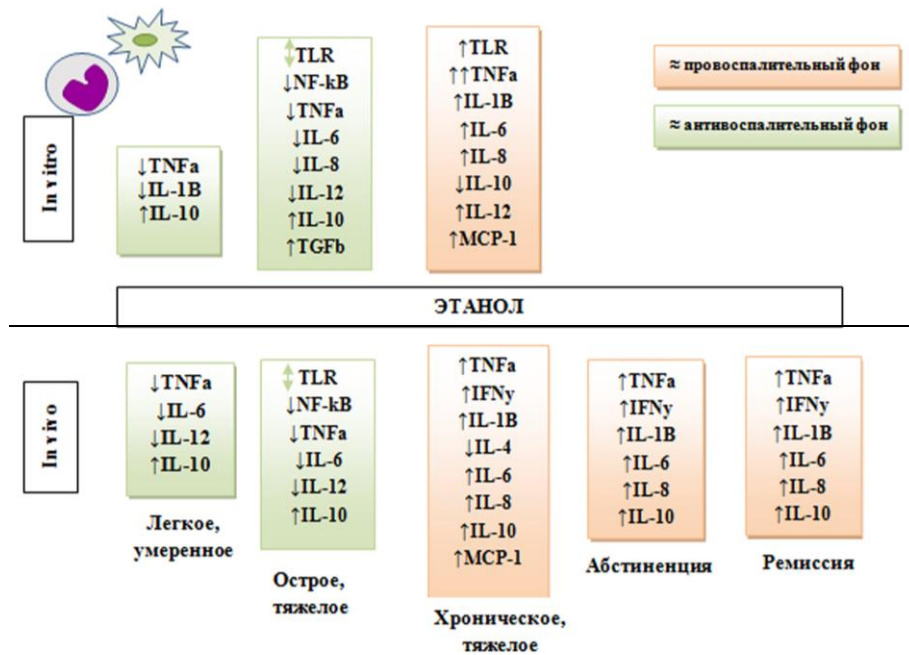


Рисунок 3. Модуляция компонентов врожденного иммунного ответа в зависимости от дозы и продолжительности воздействия этанола (*in vitro* и *in vivo*) (адаптировано из Carter R.C. et al., 2017).

Установлено, что Hsp70, связывая p50 субъединицу, уменьшает ядерную транслокацию NFκB; тогда как HSF-1, контактируя с промоторной областью TNFα, супрессирует передачу сигналов TLR-4 (Mandrekar P. et al., 2008, Muralidharan S. et al., 2014). Другими авторами было выявлено, что воздействие этанола (25 мМ) *in vitro* на моноциты периферической крови человека (в течение 6 ч.) также ингибировало TLR-индуцированный синтез TNF-α и увеличивало продукцию противовоспалительного цитокина – IL-10 (Pang M. et al., 2011). В серии экспериментальных работ *in vivo* было показано, что через 2 ч. после однократного введения через желудочный зонд самкам мышей этанола в количестве 6 г/кг массы тела (используемая доза дает пик концентрации содержания этанола в крови ≈ 0,4%, что у человека приводит к полной потере сознания) регистрируется снижение концентрации провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-12 в периферической крови в ответ на TLR2/TLR6 (зимозан), TLR4 (LPS), TLR5 (бактериальный флагеллин), TLR7 (R-848) и TLR9 (ДНК CpG) – лиганды, вводимые внутривенно или внутривенно одновременно с этанолом (Pruett B., Pruet S., 2006). В ответ на стимуляцию TLR2/TLR6 (зимозан) регистрировалось увеличение уровня IL-10 в крови (Pruett B., Pruet S., 2006). В этом же эксперименте *in vitro* также было

обнаружено снижение продукции перитонеальными макрофагами IL-6 и IL-12, выделенными через 2 ч. после инъекции ЛПС (Pruett B. et al., 2004). Наконец, этанол, вводимый мышам в концентрации 6 г/кг через пероральный зонд, способствовал значительному увеличению уровней белков острой фазы в сыворотке крови – амилоида *A* и *P*, которые обнаруживаются на ранней стадии воспалительного ответа и рекрутируют иммунные клетки в участок воспаления. При введении дозы алкоголя в 2 раза меньше этого эффекта не наблюдалось, что указывает на дозозависимые эффекты этанола в модуляции острой фазы воспалительной реакции, реализуемой через TLR4 сигналинг (Pruett B., Pruettt S., 2006). Относительно недавно было установлено, что в течение первых 20 мин. после эпизодического употребления алкоголя (≈ 130 мг/дл) добровольцами (мужчинами и женщинами) общее количество моноцитов периферической крови и ЛПС-индуцированная секреция ими TNF α , возрастали (рис. 2). Однако, как и в исследованиях *in vitro*, описанных ранее, через 2 и 5 ч. после употребления этанола, количество циркулирующих моноцитов уменьшалось, а уровень противовоспалительного цитокина IL-10 увеличивался (Afshar M. et al., 2014). В отличие от ингибирующих эффектов кратковременного воздействия этанола (25 мМ; до 24 ч.), длительная его инкубация (в течение 7 дней) с моноцитами периферической крови человека увеличивала ЛПС-индуцированную продукцию TNF α , не оказывая влияние на IL-10 (Pang M. et al., 2011). Работы с использованием линии клеток макрофагов RAW 264.7 и моноцитов периферической крови, выделенных у здоровых доноров, показали, что переход к провоспалительному ответу происходит посредством уменьшения экспрессии IRAK-M и, напротив, увеличения IRAK-1 и IKK, что приводит к повышению фосфорилирования p65 субъединицы NF κ B, стимуляции транслокации NF κ B в ядро и большей продукции TNF- α в ответ на индукцию ЛПС (Mandrekar P. et al., 2009). Другие авторы продемонстрировали противоположные результаты: продолжительное культивирование линии клеток Mono-Mac-6 с этанолом (25-75 мМ) в течение 7 дней, способствовало дозозависимому подавлению ЛПС- или ФМА-индуцированной продукции TNF α (Zhang Z. et al., 2001).

На полученных от самцов мышей первичных альвеолярных макрофагах, культивированных в питательной среде с добавлением этанола (25-100 мМ) в

течение 24 ч, было показано дозозависимое снижение эффероцитоза – процесса поглощения мёртвых нейтрофилов макрофагами (Trahtemberg U. et al., 2017), который имеет решающее значение для разрешения воспалительного процесса после инфицирования (Вое D.M. et al., 2010). Авторами было установлено, что опосредованное этанолом снижение эффероцитоза макрофагами регулируется посредством индукции активности Rho-киназы (Вое D.M. et al., 2010). Кроме того, мыши, получавшие 20% этанол в течение 8 недель, также демонстрировали снижение ЛПС-активированного эффероцитоза (Вое D.M. et al., 2010). В отличие от эффектов воздействия высоких доз этанола, моноциты, выделенные после 30-дневного умеренного потребления пива (330 мл для женщин и 660 мл для мужчин ежедневно), обладали повышенной фагоцитарной, окислительной и внутриклеточной бактерицидной активностью при инкубации с *E. coli*, по сравнению с исходным уровнем (Romeo J. et al., 2007). В подтверждение вышесказанному, при содержании самцов мышей на стандартной жидкой диете по Либеру-Де Карли (широко распространенной экспериментальной модели для грызунов, включающей хроническое употребление алкоголя) (Bertola A. et al., 2014) с использованием 6,3% этанола в течение 4 недель, происходила активация FкВ, сопровождавшаяся увеличением уровней IL-6 и TNF- α в циркуляторном русле в ответ на стимуляцию TLR4-лигандом (Maraslioglu M. et al., 2014)

Экспериментальные работы, проведенные на самцах крыс, содержащихся на жидкой диете с 35% калорий, поступающих из этанола, также показали увеличение периода полураспада мРНК TNF- α в моноцитах/макрофагах печени (Kishore R. et al., 2001). Кроме того, ЛПС-индуцированная продукция TNF- α моноцитами периферической крови, полученных от 16 госпитализированных пациентов мужского пола с алкогольным гепатитом (с не обнаруживаемыми уровнями алкоголя в крови во время исследования), была значительно увеличена по сравнению с аналогичными значениями здоровых добровольцев (McClain C.J., Cohen D.A. et al., 1989).

Как уже упоминалось ранее, ключевую роль в защите печени от патогенов играют резидентные макрофаги печени (клетки Купфера), первыми реагируя на продукты алкогольного повреждения и микробные метаболиты. Последние, взаимодействуя с TLR4 рецепторами на КК, стимулируют секрецию последними

цитокинов, таких как TNF α , IL-6 и хемокинов - KC (CXCL1), MIP-2 (CXCL2), MCP-1 (CCL2), RANTES (Mandrekar P., Szabo G., 2009; Gao B. et al., 2011; Szabo G. et al., 2011; Petrasek J. et al., 2013), запуская мощный провоспалительный каскад. В свою очередь, TNF α , взаимодействуя со своим рецептором на гепатоцитах, обуславливает развитие стеатоза, некроза и апоптоза клеток печени (Gao B. et al., 2011). Кроме того, алкоголь нарушает пластичность макрофагов в печени, подавляя активацию противовоспалительного фенотипа M2 (Louvet A., et al., 2011).

Экспериментальные работы на крысиных моделях АБП продемонстрировали, что в алкоголь-индуцированной активации TLR4 на КК важную роль играет сигнальный путь TLR4-TRIF (Hritz I. et al., 2008; Mandal P. et al., 2010). Более того, TLR4-сигналинг в иммунных и в неиммунных клетках печени, вовлечённый в процесс репарации тканей, играет также важную роль в патогенезе алкогольного гепатита и фиброза (Inokuchi S. et al., 2011). Система комплемента – система защиты, действующая в рамках как врождённого, так и адаптивного иммунитета. Большинство её белков вырабатывается в печени. Алкоголь, чрезмерно активируя систему комплемента (Cochan J.I. et al., 2010), может способствовать повреждению гепатоцитов. При активации системы комплемента образуются анафилотоксины C3a и C5a, которые взаимодействуют с одноимёнными рецепторами на лейкоцитах, опосредуя продукцию цитокинов с провоспалительным действием и как следствие, развитие воспаления (Cochan J.I. et al., 2011).

Дендритные клетки (ДК), наряду с другими элементами врожденного иммунитета, играют критическую роль в активации Т-клеток и иницировании адаптивных иммунных реакций. ДК поглощают антигены в периферических тканях, созревают, а затем перемещаются в лимфатические узлы, где происходит презентация антигенов Т-клеткам (Janeway C., 2008; O’Keeffe M. et al., 2015). Аналогично моноцитам, долгосрочная *in vitro* обработка полученных от здоровых доноров (женщин и мужчин) миелоидных ДК (мДК) этанолом (25 мМ) в течение 7 дней, приводила к снижению продукции этими клетками IL-12 и уменьшению экспрессии поверхностных ко-стимулирующих молекул – CD80 и CD86, тогда как секреция IL-10, напротив, возрастала (Mandrekar P. et al., 2004) (рис. 2). Аналогичным образом, потребление 10% этанола в качестве единственного

источника жидкости в течение 2 дней у мышей, способствовало уменьшению генерации ДК костного мозга (кМДК), снижению экспрессии CD80 и CD86 и продукции IL-12, и как следствие, регистрировалась дизрегуляция пролиферации Т-клеток (Lau A. et al., 2006).

Кроме того, мДК, полученные от здоровых добровольцев мужского и женского пола, вскоре после употребления ими 2 мл 40% этанола/кг массы тела (концентрация этанола в крови $0,095 \pm 0,02$ г/дл), демонстрировали снижение способности индуцировать пролиферацию Т-клеток в ответ на аллогенный антиген, супер-антигенный стафилококковый энтеротоксин В или столбнячный токсин, что свидетельствует о нарушенном представлении антигена (Szabo G. et al., 2004). В эксперименте с приматами был зафиксирован ингибирующий эффект этанола на ФМА-индуцированную продукцию фактора роста гепатоцитов (HGF), колониестимулирующего фактора роста гранулоцитов (G-CSF) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) мононуклеарными клетками крови, полученными у макаков мужского и женского пола после 12 мес. хронического воздействия алкоголя (Grant K.A. et al., 2008). Авторами было установлено, что снижение продукции факторов роста (в модели регулярного самоупотребления приматами этанола) опосредовано увеличением экспрессии микроРНК miR-181 и miR-221, что приводит к уменьшению экспрессии факторов транскрипции – сигнального белка и активатора транскрипции из семейства белков STAT (STAT3) и арилуглеводородного рецептора ядерного транслокатора (ARNT) (Asquith M. et al., 2013).

Таким образом, исследования *in vitro* и *in vivo* демонстрируют, что этанол модулирует функцию клеток врожденного иммунитета в зависимости от дозы и продолжительности его воздействия, а также наличия/отсутствия повреждений печени. Потребление *in vivo* умеренных количеств алкоголя увеличивает фагоцитоз и уменьшает синтез провоспалительных факторов, тогда как хроническое злоупотребление большими дозами алкоголя ингибирует фагоцитоз и продукцию факторов роста.

1.10. Влияние алкоголя на адаптивный иммунитет

Употребление алкоголя также влияет на клеточно-опосредованный и гуморальный иммунитет. В самых ранних работах было выявлено, что злоупотребление алкоголем связано с сокращением числа CD4 и CD8 субпопуляций лимфоцитов (Curtis V.J. et al., 2013) (рисунок 4). В перекрестном исследовании также было обнаружено, что злоупотребляющие (900-2980 г этанола в мес.) алкоголем мужчины имеют более низкие значения В-клеток в периферической крови, чем умеренно (300-1100 г этанола в месяц) или малопьющие (<100 г этанола в месяц) (Mili F. et al., 1992).




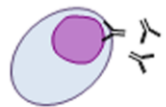
КЛЕТКИ	Умеренное употребление алкоголя	Злоупотребление Алкоголем	
	Хроническое	Острое	Хроническое
 Моноциты	↑ Фагоцитарная активность IL-6, TNFα	↓ Число клеток циркуляции IL-6, IL-12, TNFα Эфферситоз ↑ IL-10	↑↑↑ TNFα
 Дендритные клетки			↓ IL-12 CD80/CD86 ↑ IL-10
 Т-лимфоциты	↑ Число клеток циркуляции IL-2, IL-4, IL-10, IFNγ Ответ на вакцинацию ↓ Отношение IFNγ/IL-10	↑ Апоптоз	↓ Число клеток циркуляции Наивные клетки Антиген- специфический ответ Т-клетки памяти Активация
 В-лимфоциты	↑ Число клеток циркуляции ↓ IgA, IgM, IgG	↑ Апоптоз IgA	↓ Число клеток циркуляции ↑↑↑ IgA, IgM

Рисунок 4. Влияние алкоголя на иммунные клетки (адаптировано из Barr T. et al., 2016).

Кроме того, анализ, проведённый на основании обследования 153 хронических алкоголиков (мужчин и женщин) без заболеваний печени, выявил снижение у них значений индекса иммунорегуляции (CD4/CD8) Т-клеток в периферической крови (Gheorghiu M., et al., 2004). Потребление в качестве единственного источника жидкости 6% этанола в течение 8 нед. у молодых аутбридинговых мышей приводило к уменьшению числа CD3⁺ Т-клеток на 75% по сравнению с его исходным уровнем (Percival S.S. et al., 2000). Аналогично, у

самцов крыс, которым вводили жидкую диету, содержащую 8,7% этанол на протяжении 4 нед., наблюдали прогрессирующую потерю как CD4, так и CD8 Т-клеток (Boyadjieva N.I. et al., 2002). Повышенный апоптоз Т- и В-лимфоцитов, выделенных из тимуса, селезенки и лимфатических узлов у самцов мышей, наблюдался в результате 16-часовой их инкубации с 0,4-2% этанола (Slukvin I.I., Jerrells T.R., 1995). В отличие от этих результатов, умеренное потребление пива (330 мл для женщин и 660 мл для мужчин ежедневно) в течение 30 дней приводило к значительному увеличению количества лейкоцитов, зрелых CD3 Т-лимфоцитов, нейтрофилов и базофилов у женщин и базофилов у мужчин (Romeo J., 2007). Кроме того, было показано влияние злоупотребления алкоголем на конверсию фенотипа наивных Т-лимфоцитов (рис. 2). Так, у взрослых мужчин, употреблявших около 400 г этанола в день в течение примерно $25,6 \pm 11,5$ лет, отмечался сниженный процент наивных (CD45RA) клеток в CD4/CD8 популяциях Т-лимфоцитов, тогда как число примированных (CD45RO) Т-клеток, возрастало (Cook R.T. et al., 1994; Cook R.T., 1995). Аналогично, в эксперименте на мышах (самцах и самках) хроническое потребление 20% этанола в питьевой воде в течение 6 мес. уменьшало число пула наивных Т-клеток и увеличивало процент Т-клеток памяти в результате повышенной гомеостатической пролиферации последних (Zhang H., 2005). Следует отметить, что повышение содержания Т-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. (Chou J.P., 2013; Sokhonevich N.A., 2015; Todosenko N.M., 2017), а уменьшение пула наивных Т-клеток ассоциировано с нарушением/снижением формирования эффективных иммунных реакций на инфекцию и вакцинацию (Arrau V., 2014).

У взрослых мужчин, употреблявших этанол, в среднем 230-400 г/сут. в течение $26 \pm 4,3$ лет, было зафиксировано значительное увеличение количества активированных CD8 Т-клеток, экспрессирующих HLA-DR и CD57, которое сохранялось до 10 дней абстиненции (Cook R.T., 1995; Cook R.T., 1995). Мыши, которые получали 20% этанол в воде в течение 6 мес., также имели высокий процент активированных (CD43, Ly6C-позитивных) Т-клеток в крови, демонстрируя быстрый IFN- γ -опосредованный ответ и повышенную

чувствительность к низким уровням стимуляции Т-клеточного рецептора (TCR) (Zhang H., 2005).

У пациентов (взрослые мужчины) с тяжелой степенью алкоголизма (900-2490 г этанола в мес.; 90/249 условных доз в мес.) было зарегистрировано увеличение концентрации IgA и IgM в крови по сравнению с мало пьющими (90 г этанола в мес.; <9 условных доз) или умеренно пьющими (300-900 г этанола в мес.; 30/90 условных доз) (Mili F. et al., 1992). Аналогичным образом, исследование, проведенное среди 460 мужчин и 221 женщины с разной степенью алкоголизма, обнаружило дозозависимое увеличение уровней IgA в сыворотке крови (Gonzalez-Quintela A., 2008) (рис. 2). Кроме того, спонтанный синтез IgA мононуклеарными клетками крови, полученными от пациентов, страдающих алкоголизмом и имеющих сопутствующие заболевания печени, был выше, чем в контрольной группе (Wands J.R., 1981). В то же время у самок крыс Wistar, при внутрибрюшинном введении этанола (4 г/кг) в течение 30 мин., было зафиксировано увеличение концентрации IgA в слизистой оболочке кишечника (Budes M., 2007). Наконец, обработка гибридомной клеточной линии этанолом (25, 50, 100 и 200 мМ) в течение 48 ч. приводила к линейному увеличению продукции IgM (Muhlbaueer E., et al., 2001). Предполагают, что повышенная секреция иммуноглобулинов у категории алкоголизирующих лиц может быть обусловлена воздействием ацетальдегида на белки печени и перекисным окислением липидов клеточных мембран малондиальдегидом, что приводит к потенциальному иницированию аутоиммунных реакций (Thiele G.M. et al., 2010). Интересным является тот факт, что уровни IgG, IgM и IgA в крови лиц умеренно употребляющих алкоголь (независимо от гендерной принадлежности), были снижены в сравнении со злоупотребляющими (Romeo J. et al., 2007) (рис. 2). Аналогичным образом, у категории умеренно употребляющих алкоголь, наблюдались более низкие уровни IgG по сравнению с группой людей, полностью воздерживающихся от спиртных напитков (Gonzalez-Quintela A., 2008).

Резюмируя вышесказанное, нужно отметить, что индуцированная хроническим потреблением алкоголя Т-клеточная лимфопения увеличивает количество активированных Т-клеток и их гомеостатическую пролиферацию, что приводит к росту числа Т-клеток памяти относительно наивных лимфоцитов.

Умеренное потребление алкоголя обладает противоположным действием. Алкоголь также способен модулировать продукцию иммуноглобулинов.

1.11. Влияние алкоголя на гуморальные факторы

Несколько больших исследований, включавших более 2000 участников эксперимента, показали J-образную зависимость между потреблением этанола и уровнями С-реактивного белка в плазме крови, маркера острой фазы воспаления (Imhof A. et al., 2001; Albert M.A. et al., 2003; Pai J.K. et al., 2006). Сообщалось также о выявленных J-образных зависимостях между содержанием IL-6, белков острой фазы – альбумина и трансферрина и потреблением алкоголя (Imhof A. et al., 2001; Pai J.K. et al., 2006). Интересно отметить наличие сильной обратной линейной связи между увеличением потребления алкоголя у мужчин и женщин и ростом содержания в плазме крови растворимых рецепторов 1 и 2 типа к TNF α (sTNF-R1 и sTNF-R2) (Pai J.K. et al., 2006). Последние опосредуют активность TNF α и имеют взаимосвязь с повышенным риском неблагоприятного исхода сердечно-сосудистых заболеваний (Albert M.A. et al., 2003). Мультиплексный анализ плазмы крови (в формате проточной флюориметрии), полученной у 24 здоровых мужчин после умеренного употребления алкоголя, также продемонстрировал значительное снижение концентрации белков острой фазы воспаления – ферритина и α 1-антитрипсина, антагонистов рецепторов провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-18 и повышение уровня противовоспалительного белка адипонектина (Joosten M.M. et al., 2012). В модельном эксперименте у обезьян, употреблявших этанол в течение 32 мес. (со средним дневным потреблением 4,0 г/кг/день, что соответствует концентрации этанола в крови 400 мг/дл), было обнаружено снижение уровня циркулирующих факторов, ответственных за рекрутирование иммунных клеток в очаг инфекции, таких как хемокины CCL3/4 и металлопротеазы MMP-9 (Helms C.M. et al., 2012). В то же время снижение концентрации IL-2 и CCL5 в периферической крови позволяет сделать выводы о возможных механизмах супрессии процессов рекрутинга и пролиферации Т-клеток на фоне приема алкоголя, компенсируемых повышением продукции IL-7 и IL-15. Авторы также отметили алкоголь-индуцированное снижение продукции IgE, опосредованное супрессией синтеза его регуляторов – IL-13 и CD40-лиганда (Helms

С.М. et al., 2012). Наблюдения за обезьянами, получавшими умеренные (2 г/кг/день) дозы алкоголя также показали, что у этих животных регистрировались повышенные уровни IL-2, IL-15, IL-12, TNF- α , RANTES и Т-клеточного хемоаттрактанта CXCL9, по сравнению с группой, получавшей более высокие дозы этанола, и группой, не получавшей его (Takkouche B. et al., 2002). Результаты исследования, по мнению авторов, вполне обосновывают реализацию более эффективного ответа животных из первой группы на модифицированную осповакцину Анкара по сравнению с двумя другими группами, поскольку эти факторы имеют решающее значение для пролиферации лимфоцитов, активации Т-клеток и эффекторной функции иммунных клеток (Takkouche B. et al., 2002).

Как уже упоминалось ранее, алкоголь-индуцированная активация КК через TLR-сигналинг, опосредует продукцию множества цитокинов с провоспалительным действием (Szabo G. et al., 2011). TNF α является основным медиатором при АБП (McClain C.J., Cohen D.A., 1989), экспрессируясь в ответ на воздействие этанола; его продукция соизмерима со степенью повреждения печени (Gao B. et al., 2012; Wang H.J. et al., 2012). Выявлено, что TNF α , наряду с другими NF- κ B-индуцируемыми молекулами, стимулирует экспрессию IL-8, уровни которого значительно возрастают при алкогольном гепатите (Sheron N. et al., 1993). Сывороточная концентрация IL-17 также повышена при АБП; предполагают, что IL-17 играет роль в развитии воспаления при фиброзе печени (Lemmers A. et al., 2009). Исследования мышинных моделей алкогольного стеатогепатита показали (Petrasek J. et al., 2012), что IL-1 β также является важным цитокином при воспалении и прогрессировании фиброза печени, индуцированных алкоголем. Активация IL-1 β происходит посредством инфламмасом, крупных белковых комплексов, состоящих из NOD-подобных рецепторных белков, чувствительных к аларминам, каспазе 1, апоптоз-ассоциированному speck-подобному белку, содержащему CARD-домен (ASC) (Szabo G., Csak T., 2012). **Так**, у мышей, получавших алкоголь, происходит активация инфламмасом в КК (Petrasek J. et al., 2012); то же происходит в гепатоцитах, подвергшихся воздействию ЛПС и жирных кислот (Csak T. et al., 2011). Блокада IL-1 β значительно снижает воспаление и повреждение клеток паренхимы печени (Petrasek J. et al., 2012). Интересно отметить, что воздействие алкоголя индуцирует также экспрессию

антивоспалительных цитокинов (Gao B., 2012; Wang H.J. et al., 2012). Однако остаётся неясным, является ли экспрессия противовоспалительных цитокинов компенсаторным ответом иммунной системы на индуцированную этанолом продукцию медиаторов воспаления, или же реакцией на повреждение клеток этанолом.

Хемокины, наряду с другими медиаторами, участвуют в патогенезе АБП. Так, MCP-1 играет основную роль в алкоголь-индуцированном воспалении печени, активируя продукцию провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками и повышая инфильтрацию печени нейтрофилами (Degre D. et al., 2012). Усиление экспрессии MCP-1 регистрируется в КК и гепатоцитах мышей при добавлении им алкоголя в пищу (Mandrekar P. et al., 2011). Интересно, что включение алкоголя в рацион MCP-1-дефицитным мышам снижало, в целом, уровень окислительного стресса, проявления стеатоза и экспрессию провоспалительных цитокинов по сравнению с параметрами у мышей дикого типа (Mandrekar P. et al., 2011). При АБП повышение сывороточных уровней MCP-1 и IL-8 у пациентов ассоциировано с тяжестью повреждения печеночной паренхимы (Degre D. et al., 2012). Фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) – мультифункциональный провоспалительный цитокин и хемокин, также играет важную роль в начальных и поздних стадиях АБП, что было показано на экспериментальных моделях АБП у мышей (Barnes M.A. et al., 2013). Как и MCP-1, MIF играет роль в алкоголь-индуцированной аккумуляции липидов в печени (Barnes M.A. et al., 2013). MIF-дефицитные мыши защищены от ряда эффектов алкоголя, в том числе от повреждения гепатоцитов и их апоптоза (Barnes M.A. et al., 2013).

Печень также является органом-мишенью для действия гормонов жировой ткани, адипокинов, один из которых лептин – ключевой регулятор энергетического баланса и аппетита (DePaoli A.M., 2014). Установлено, что действие этанола способствует потере массы тела, и как следствие, снижению продукции лептина ЖТ (Tan X., 2012). Другие исследователи выявили прямо противоположные результаты (Kasztelan-Szczerbinska B., 2013). Лептин оказывает воздействие на различные типы непаренхиматозных клеток печени, участвующих в ее повреждении, в том числе, за счет повышения продукции провоспалительных

цитокинов (Kasztelan-Szczerbinska B., 2013). Адипонектин, напротив, наряду с метаболическими эффектами, оказывает протекторное действие при различных заболеваниях печени (Udomsinprasert W. et al., 2018). Биологические реакции адипонектина опосредованы связыванием с его рецепторами, основные из которых (AdipoR1 и AdipoR2) представлены на гепатоцитах. Адипонектин способен угнетать воспалительные процессы, подавляя пролиферацию и миграцию ЗКП (Ramezani-Moghadam M., et al., 2015). Следует отметить, что для различных патологий печени характерна гиперадипонектинемия или гипoadипонектинемия (Udomsinprasert W. et al., 2018). Так, в работе Balmer M.L. и др., (2010) было продемонстрировано, что у больных на стадии цирроза печени уровни адипонектина были значительно повышены, тогда как у больных НАЖБП, напротив, продукция адипонектина была снижена (Balmer M.L., 2010). Подавление экспрессии и секреции адипонектина адипоцитами *in vitro* и *in vivo* установлено в моделях хронического воздействия алкоголя у животных (Gamberi T., 2018).

Таким образом, на основании имеющихся данных можно утверждать, что употребление алкоголя оказывает дозозависимое влияние на локальный и системный (в периферической крови) уровень некоторых цитокинов, хемокинов, факторов роста и гормонов локально. Показано участие про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов в патогенезе АБП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог вышесказанному, следует отметить, что поддержание нормального гомеостаза печени, а также защита организма от патогенов, опухолевых клеток и повреждения тканей, осуществляются посредством запуска в печени механизмов воспаления, которые инициируют, опосредуют и устраняют системные и местные иммунные реакции, способствуя, в то же время, формированию патологии печени. Разнообразный репертуар популяций иммунных клеток в печени, наряду с провоспалительным потенциалом негемопоэтических клеток, играет центральную роль, как в гомеостатическом, так и в патологическом воспалении печени. Комплексные воспалительные и иммунорегуляторные механизмы в печени необходимы для поддержания органного и системного

гомеостаза, а также для мобилизации воспалительных механизмов для защиты от инфекции, метастазов и повреждения тканей. Чрезмерная или дисрегуляторная воспалительная активность печени сопровождается формированием патологии органа. Алкоголь оказывает влияние на все ткани и органы у людей и животных. Печень является основной мишенью действия алкоголя. В целом, у 90% злоупотребляющих алкоголем, формируется стеатоз печени; при этом более чем у 1/3 из этой категории, развиваются более тяжелые поражения печени, включая алкогольный гепатит, фиброз, цирроз, а также рак печени. Хронические заболевания печени, опосредованные систематическим потреблением алкоголя, составляют до 50% всех случаев цирроза печени. В тоже время выявлено, что употребление этанола, даже умеренное, изменяет врожденные и адаптивные иммунные реакции, выявляя специфические нарушения в зависимости от длительности и интенсивности приема (острое, хроническое) и наличия/отсутствия патологии печени алкогольного генеза. Несмотря на наличие многих работ, освещающих аспекты патогенеза АБП, молекулярные механизмы ее формирования, в контексте напряжения механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, остаются недостаточно изученными, из-за отсутствия систематического анализа, оценивающего влияние концентрационных характеристик и разных временных периодов употребления этанола. Представляется вполне логичным, что терапевтические стратегии лечения хронических заболеваний печени, должны быть направлены на восстановление ее иммунологического гомеостаза.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В основу работы положены результаты комплексного обследования 62 больных алкогольным фиброзом печени (АФП, МКБ 10 - K70.2; 32 женщины и 30 мужчин в возрасте 46.4 ± 5.6 лет), 15 пациентов, злоупотребляющих алкоголем без нарушенной функции печени (8 женщин и 7 мужчин в возрасте 42.1 ± 4.2 лет) и 20 условно здоровых доноров (10 женщин и 10 мужчин в возрасте 38.3 ± 6.4 лет). Пациенты с АФП были ранжированы на 4 группы, в зависимости от ст. фиброза (по шкале METAVIR, I ст. - 17 человек, II ст. - 16 человек, III ст. - 17 человек, IV (цирроз) ст. - 12 человек) (таблица 1).

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.

На основании оценки анамнеза болезни в исследование были включены пациенты, отвечающие **следующим критериям:**

- лица в возрасте от 18 до 65 лет с верифицированным в условиях специализированного стационара диагнозом алкогольный фиброз печени (*разной степени*);
- давность алкогольной болезни печени не превышала более 10 лет; обязательное подписание информированного согласия на участие в исследовании и использование биологического материала в целях исследования.
- категория сильнопьющие (4200 – 5600 гр 100% этанола в месяц)

— стаж употребления алкоголя не менее 3 и не более 10 лет.

Взятие образцов венозной крови для оценки ряда параметров (*биохимических, молекулярных, иммунологических*) у пациентов, злоупотребляющих алкоголем с фиброзом печени и без него осуществлялось в условиях стационара в период воздержания от употребления алкоголя (на 7-ые сутки после детоксикационной терапии), что было необходимым условием для исключения прямого влияния алкоголя на изучаемые параметры.

Критерии исключения: возраст до 18 лет и после 65 лет; ранее перенесенная холецистэктомия; желчекаменная болезнь; острые и тяжелые хронические соматические и инфекционные сопутствующие заболевания, обострение хронических воспалительных процессов, наследственные и психические болезни; длительный прием гиполипидемических препаратов, а также больные, отказавшиеся в ходе исследования от врачебного и лабораторного контроля. У всех пациентов с фиброзом печени алкогольного генеза был исключен *диагноз вирусных гепатитов HBV и HCV*.

Пациенты с АФП и без нарушений структуры и функций печени (*группа сравнения*), вошедшие в исследование, имели в анамнезе хроническое злоупотребление алкоголем и характеризовались как сильнопьющие (4200 – 5600 гр 100% этанола в месяц), со стажем употребления алкоголя не менее 3 и не более 10 лет.

В контрольную группу были включены условно здоровые доноры (20 человек) с аналогичными характеристиками по полу и возрасту, не предъявлявшие на момент обследования жалоб соматического профиля. В анамнезе лиц контрольной группы отсутствовало злоупотребление алкоголем, а также: отсутствовали аллергические заболевания, обострения хронических воспалительных процессов, инфекционных заболеваний, наследственные и психические болезни, а также злоупотребление курением, наркотическая зависимость. От момента последнего эпизода ОРВИ не менее двух месяцев. У всех обследованных лиц этой группы было установлено отсутствие кардиоваскулярной патологии, нарушений углеводного, белкового и липидного обменов. Распределение больных АФП по стадиям фиброза приведено в **таблице 2**. Со всеми пациентами было подписано добровольное информированное согласие на

исследование. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете БФУ им. И. Канта (протокол от 26 декабря 2017 года).

Таблица 2. Распределение больных алкогольным фиброзом печени по стадиям

Критерии	Показатели				Условно здоровые доноры	Без АФП
	I	II	III	IV		
Стадия фиброза по METAVIR						
Количество пациентов, n	17	16	17	12	20	15
Возраст, лет	43,5±3,28	46,92±5,39	44,39±5,33	42,91±6,03	38,3±6,4	42,1 ± 4,2
Мужчины/ женщины	8/9	8/8	9/8	6/6	10/10	7/8

2.2. Материал исследования

Материалом для исследований являлась кровь, полученная путем пункции локтевой вены, взятая утром натощак. Кровь забирали в вакуумные пробирки Vacuette («Greiner-bio-one», Австрия) с активатором свертывания для получения сыворотки, и с антикоагулянтами (ЭДТА и гепарин) для получения плазмы крови.

Для определения биохимических показателей, молекул внеклеточного матрикса, про- и противовоспалительных факторов в сыворотке крови использовали кровь с активатором свертываемости. Для оценки адипокинов – адипонектина и лептина в плазме крови использовали кровь, стабилизированную ЭДТА. Для исследования иммунофенотипического профиля лимфоцитов использовали образцы цельной венозной крови, стабилизированной гепарином.

2.3. Методы исследования

У больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса, лиц, злоупотребляющих алкоголем без нарушений структуры и функций печени и у здоровых доноров проводили:

- комплексное исследование биохимических показателей крови;
- определение сывороточного содержания про- (IL-6, IL-8, TNF α) и противовоспалительных (IL-10, TGF- β 1) факторов, молекул ВКМ: TIMP-1, коллагена IV типа, ГК и P-III-NP) методом иммуноферментного анализа;
- плазменного содержания адипокинов (лептина и адипонектина) методом проточной флуориметрии;
- оценку параметров клеточного иммунитета и регенерации методом проточной цитофлуориметрии;
- определение фагоцитарной активности моноцитов периферической крови с использованием НСТ-теста.

Распределение здоровых доноров и обследованных пациентов по группам в соответствии с использованными методами исследования представлено в **таблице 3**.

2.3.1. Исследование биохимических показателей крови

Биохимические исследования сыворотки крови проводились на автоматическом биохимическом анализаторе Furuno CA-180 («Furuno Electric Company», Япония) с применением тест-систем DiaSys («DiaSys Diagnostic Systems», Германия).

Определение концентрации общего билирубина

Общий сывороточный билирубин определялся с применением фотометрического колориметрического теста с 2,4-дихлоранилином (ДХА) с помощью набора реагентов «BilirubinAutoTotal FS» (DiaSys, Германия).

Принцип метода: детекция билирубинового азосоединения красного цвета, образующегося в присутствии диазотированного 2,4-дихлоранилина.

Референсные значения общего билирубина в сыворотке крови: 1,7-21 мкМоль/л.

Определение активности аминотрансфераз (аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ))

Активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови определяли с помощью набора реагентов «ASAT GOT FS (IFCC mod)» (DiaSys, Германия). Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови определяли с помощью набора реагентов «ALAT GTP FS (IFCC mod)» (DiaSys, Германия).

Принцип метода: детекция окрашенных гидразонов пировиноградной и щавелевых кислот, образованных в результате реакции переаминирования под воздействием АсАТ и АлАТ.

Референсные значения АсАТ в сыворотке крови: женщины до 31 Е/л, мужчины до 35 Е/л. Референсные значения АлАТ в сыворотке крови: женщины до 31 Е/л, мужчины до 41 Е/л.

Определение активности гамма-глутамилтрансферазы (гамма-ГТ, ГГТ)

Активность гамма-глутамилтрансферазы (гамма-ГТ) определяли с помощью набора реагентов «Gamma-GT FS» (DiaSys, Германия).

ГГТ катализирует перенос глутаминовой кислоты на акцепторы, подобные глицилглицину, при этом становится возможным измерение концентрации высвобождаемого 5-амино-2-нитробензоата в реакционной смеси. Увеличение поглощения при длине волны 405 нм прямо пропорционально активности гамма-ГТ.

Референсные значения ГГТ в сыворотке крови: женщины до до 32 Е/л, мужчины до55 Е/л.

Определение активности щелочной фосфатазы (ЩФ)

Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли с помощью набора реагентов « Alkalinephosphatase FS DGKC» (DiaSys, Германия).

Принцип метода: под действием гидролитического фермента щелочной фосфогидролипазы п-Нитрофенилфосфат+Н₂О переходит в детектируемое при

длине волны 405 нм соединение Фосфат+п-Нитрофенол, после чего определяется оптическая плотность реакционной смеси .

Референсные значения ЩФ в сыворотке крови: до 258 Е/л.

Определение концентрации С-реактивного белка

Концентрацию С-реактивного белка (СРБ) определяли с помощью набора реагентов «CRP FS» (DiaSys, Германия).

Принцип метода: определение концентрации СРБ по конечной точке методом фотометрии в результате реакции антиген-антитело между антителами к человеческому СРБ, иммобилизованными на полистироловых частицах, и СРБ, присутствующим в пробе.

Референсные значения СРБ в сыворотке крови: до 6 мг/л.

2.3.2. Определение содержания молекул внеклеточного матрикса (TIMP-1, коллагена IV типа, ГК, Р-III-NP) в сыворотке крови

Для определения содержания молекул **внеклеточного матрикса** (TIMP-1, коллагена IV типа, ГК, Р-III-NP) в сыворотке крови использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA).

Принцип метода. Суть метода заключается в связывании молекул цитокина с адсорбированными в лунках планшета антителами. Образовавшийся комплекс взаимодействует с конъюгатом, меченым биотином, избыток которого в последующем удаляется после инкубации с помощью промывки. Субстратный раствор, добавленный к сорбированным на твердой фазе комплексам «цитокин-антитело» образует окрашенный комплекс. Затем реакцию останавливали внесением «стоп-реагента» и определяли оптическую плотность раствора, которая пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически.

Ход определения. Во все лунки иммунологического планшета вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов, затем добавляли по 100 мкл «0 дозы»,

стандартов, контролей и образцы плазмы. Затем планшет инкубировался при 37°C в шейкере-инкубаторе (700 об/мин) в течение 2 ч.

Не связавшийся материал удалялся 5-кратным циклом отмывки на автоматической станции. Затем вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №1 (антитела к TIMP-1, коллагена IV типа, ГК, P-III-NP в сыворотке крови человека с биотином) во все лунки и инкубировали в течение 1 часа в аналогичных условиях. Несвязавшийся конъюгат удаляли 5-кратным циклом автоматической отмывки. Далее добавляли по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена) в каждую лунку и инкубировали в течение 30 мин при тех же условиях. Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ) вносили в количестве 100 мкл после 5-кратной промывки и инкубировали в темноте в течение 30 мин. при температуре 18-25°C. Реакцию останавливали внесением в ячейки раствора стоп-реагента (0,5 М серной кислоты).

Количественную оценку сывороточного содержания молекул ВКМ (TIMP-1, коллагена IV типа, ГК, P-III-NP) проводили с использованием наборов реагентов: «HA Test Kit» (Corgenix, Inc, USA), «Serum Collagen IV EIA» (Biotrin, Ireland), «Biosource Human TIMP-1 ELISA» (Invitrogen Corporation, UK); «P-III-NP» (Wuhan USCN Business Co., Ltd, China) в соответствии с инструкциями фирм-производителей на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lasurit (Dynex Technologies, США).

2.3.3. Определение содержания молекул с про (IL-6, IL-8, TNF α) и противовоспалительным (IL-10 и TGF- β 1) действием в сыворотке крови

Для определения содержания молекул с про (IL-6, IL-8, TNF α) и противовоспалительным (IL-10 и TGF- β 1) действием в сыворотке крови использовали твердофазный иммуноферментный сэндвич-метод (ELISA).

Принцип метода. См. пп. 2.3.3.

Ход определения. Во все лунки иммунологического планшета вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов, затем добавляли по 100 мкл «0 дозы», стандартов, контролей и образцы плазмы. Инкубация планшетов проходила при 37°C с интенсивным помешиванием (700 об/мин) в течение 2 ч.

Не связавшийся материал удалялся 5-кратной отмывкой на автоматическом вошере. В последующем добавляли по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №1 (антитела к IL-6, IL-8, IL-10, TNF α или TGF- β 1 в сыворотке крови человека с биотином) во все лунки и инкубировали в течение 1 часа при тех же условиях.

Несвязавшийся конъюгат удаляли 5-кратным циклом отмывки на автоматическом вошере. Далее добавляли по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена) в каждую лунку и инкубировали в течение 30 мин при тех же условиях.

Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ) вносили в количестве 100 мкл после 5-кратной промывки и инкубировали в темноте в течение 30 мин. при температуре 18-25°C. Реакцию останавливали добавлением в ячейки раствора 0,5 М серной кислоты (стоп-реагент).

Иммуноферментный анализ по определению концентрации молекул IL-6, IL-8, IL-10, TNF α в сыворотке крови проводили согласно инструкциям, предлагаемым производителем тест-систем «Вектор Бест» (Россия), определение сывороточного уровня TGF- β 1 в соответствии с инструкцией фирмы-производителя «DRG Diagnostics» (Германия).

Процедуру выполнения иммуноферментного анализа по определению концентрации медиаторов осуществляли на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lasurit (Dynex Technologies, США).

2.3.4. Определение концентрации лептина и адипонектина в плазме крови

Количественная оценка лептина в плазме проводилась методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad, USA) с использованием коммерческой тест-системы Bio-Plex Pro Human Diabetes 10-Plex Assay (Bio-Rad, США).

Принцип метода основан на связывании детектируемых молекул со специфическими антителами, адсорбированными на поверхности магнитных микросфер, что позволяет определять до 100 аналитов в одной лунке.

Ход определения. Для исследования были использованы 96-луночные планшеты формата Bio-Plex, в лунки которых вносили по 50 мкл суспензии с микросферами, затем дважды отмывали буферным раствором с помощью промывочной станции Bio-Plex Pro Wash Station (Bio-Rad, США). Затем, следуя протоколу, вносили по 50 мкл растворов стандартных и исследуемых образцов в соответствующие лунки планшета и инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре в шейкере-инкубаторе. После 3-кратного цикла отмывки инкубировали с добавлением 25 мкл специфических антител. По окончании второй инкубации проводили 3-кратную отмывку, после чего вносили 100 мкл стрептавидина-PE, конъюгированного с биотинилированными антителами. Инкубировали в темноте, при комнатной температуре 10 мин при 300 об/мин. После 3-х кратной отмывки, вносили в каждую лунку по 125 мкл буфера, затем после 30 сек встряхивания помещали планшет на микропланшетную платформу Bio-Plex. Результаты считывались на автоматическом микропланшетном фотометре Bio-Plex-200 System (Bio-Rad, США) с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager (Bio-Rad, США). Концентрации лептина и адипонектина определялись по стандартной кривой (определяемый динамический диапазон 2-32 000 пг/мл) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

2.3.5. Иммунофенотипический анализ лимфоцитов в образцах лизированной венозной крови

При подготовке проб для проведения иммунофенотипического анализа в образцах цельной венозной крови использовалась методика окрашивание-лизис. Образцы цельной венозной крови в объеме 10 мкл были инкубированы при +4С⁰ 30 минут 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, CD14, CD25, Foxp3) определялось при помощи метода

проточной лазерной цитометрии с использованием коктейля моноклональных антител, конъюгированных с Viablue (CD45); аллофикоцианином (APC) (CD19, CD25, CD62L); флуоресцинизиотионатом (FITC) (CD4, CD16, CD14, CD34, CD45R0), фикоэритрином (PE) (CD8, CD56, CD133, Foxp3); с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7) (CD3), согласно протоколам производителей (Miltenyi Biotec, Германия; Abcam, Cambridge, Великобритания; e-Bioscience, США).

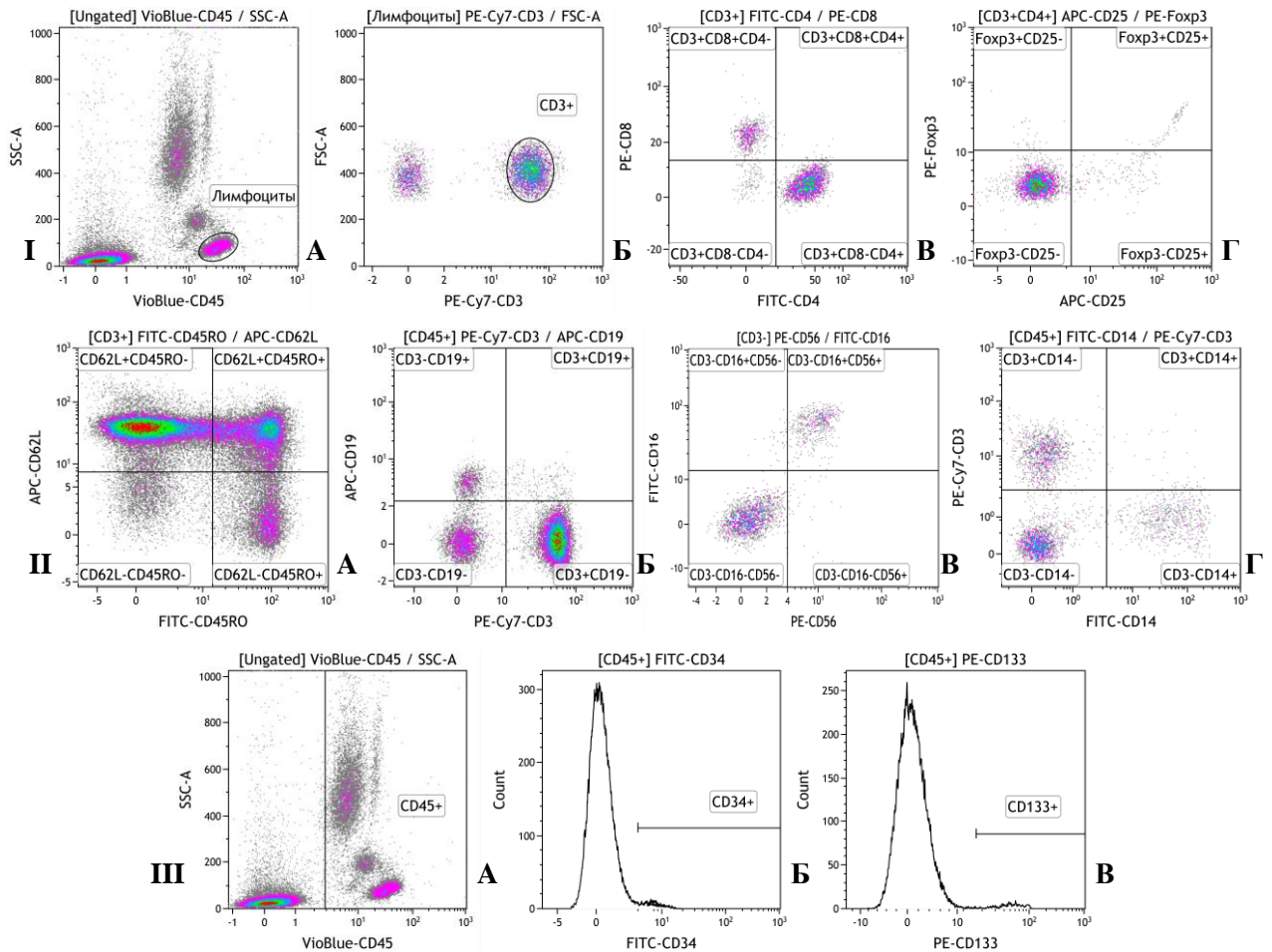


Рисунок 5. Тактика «гейтирования» основных субпопуляций лимфоцитов в образцах лизированной крови.

(I) Гистограммы распределения $CD45^+$ лимфоцитов (A), субпопуляций (CD3, CD4, CD8) (Б, В) а также $CD25^+Foxp3^+$ Т-клеток (Г) в гейте $CD3^+CD4^+$ клеток в образцах лизированной крови здорового донора, полученные в результате многоцветного анализа с использованием коктейлей моноклональных антител.

(II) Гистограммы распределения субпопуляций Т-клеток памяти (А), В-клеток (Б), NK-клеток (В) в гейте $CD45^+$ клеток (лимфоциты) и моноцитов (Г) в гейте $CD45^+$ клеток (лимфоциты, моноциты) в образцах лизированной крови здорового донора, полученные в результате многоцветного анализа с использованием коктейлей моноклональных антител.

(III) Однопараметрические гистограммы, отражающие содержание (%) гемопоэтических клеток (Б, В) «гейтированные» по CD45⁺ клеток (А) в образцах лизированной крови здорового донора, полученные в результате многоцветного анализа с использованием коктейлей моноклональных антител.

Регистрация результатов проводилась на проточном цитофлюориметре 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*
- *CD45-Viablue, CD3-PE.Cy7, CD14- FITC*
- *CD45-Viablue, CD3- PE.Cy7, CD4-FITC, CD25- APC, Foxp3-PE.*

Все результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

2.3.6. Определение фагоцитарной активности моноцитов периферической крови

Фагоцитарную активность моноцитов периферической крови оценивали методом J.S. Steward et al. в модификации Б.С. Нагоева. В пластиковые пробирки помещали 200 мкл лейкоконцентрата (для моноцитов), смешивали с 0,9% раствором NaCl и центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин. После удаления надосадка, инкубировали с добавлением 200 мкл раствора НСТ 30 мин при температуре 37 °С. Готовили толстые мазки крови, которые после фиксации в течение 3 минут метанолом промывались в проточной воде и сушились. Затем окрашивали в течение 1 мин. бриллиантовым зеленым и после промывки проточной водой, высушивали и докрашивали 0,5% раствором сафранина в течение 10 мин. Индуцированный НСТ-тест проводили аналогичным образом, после стимуляции поглотительной способности нейтрофилов и моноцитов пирогеналом (25 МПД). Для

количественного выражения результатов подсчитывали 200 нейтрофилов и моноцитов в мазке и вычисляли процентное содержание исследуемых клеток с отложениями диформаза в виде гранул или сплошных комков.

2.3.7. Методы статистического анализа данных

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. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Для нормально распределенных выборок вычисляли средневывборочные характеристики: среднее арифметическое (\bar{X}), среднее квадратичное отклонение (σ), ошибка среднего (m). Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану (M), первый и третий квартили (Q_1 , Q_3).

При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий Kruskal-Wallis. С целью попарного сравнения показателей в исследуемых группах применяли критерий Манна Уитни для независимых групп. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. 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 $p < 0,05$ (Кремер Н.Ш., 2004).

Таблица 3. Распределение обследованных лиц по группам в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Здоровые доноры n=20	Группа сравнения без АФП n=15	Больные АФП			
			I ст., n=17	II ст., n=16	III ст., n=17	IV ст., n=12
Группы исследования						
Оценка биохимических параметров	20	15	17	16	17	12
Определение содержания молекул фиброгена/фибриногена в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа	20	15	17	16	17	12
Определение содержания молекул внеклеточного матрикса в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа	20	15	17	16	17	12
Иммунофенотипический анализ образцов цельной венозной крови методом проточной цитофлюориметрии	20	15	17	16	17	12
Флуориметрическая активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови в НСТ-тесте	20	15	17	16	17	12

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оценка биохимических параметров у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса

Исследование биохимических показателей у пациентов с АФП позволило выявить значимые отличия от контрольных параметров и аналогичных значений группы сравнения (без АФП) (таблица 4).

Уровень активности печеночных ферментов – аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТ) в сыворотке крови условно здоровых доноров соответствовал значениям - $17,77 \pm 3,48$; $21,96 \pm 4,63$; $136,74 \pm 11,18$ и $12,90 \pm 2,73$ Ед/л, соответственно. Параметры, ассоциированные с метаболической функцией печени в группе сравнения (без АФП), *в целом*, не выходили за пределы референтных, однако значения уровня активности ГГТ почти в 2 раза превышали контрольные цифры (таблица 4).

Исследуемые показатели в группе больных АФП повышались (относительно контроля) уже на I ст. фиброза, достигая максимальных значений на терминальной стадии процесса (таблица 4). Результаты регрессионного анализа позволили продемонстрировать положительную зависимость уровня активности ферментов АсАТ и ГГТ у больных АФП со ст. фиброза (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,671$, $p=0,036$ и $r^2 = 0,801$, $p=0,023$, соответственно).

При хронических вирусных заболеваниях печени и хроническом алкоголизме, а также неалкогольной жировой болезни печени, повышенное соотношение АсАТ / АлАТ является предиктором отдаленных осложнений, включая фиброз и цирроз печени (Botros M., Kenneth A. S., 2013).

Коэффициент де Ритиса, представляющий собой соотношение между уровнями АсАТ и АлАТ в сыворотке крови у условно здоровых доноров был равным $1,22 \pm 0,22$ усл. ед.; у лиц группы сравнения (без АФП) исследуемый показатель значимо не отличался от контрольных цифр, составляя $1,35 \pm 0,21$ усл. ед. (таблица 4).

Таблица 4. Биохимические показатели у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса ($\bar{X} \pm m$)

Показатели, ед. изм.	Характеристика обследованных					
	Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I ст. n=33	II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
	0	1	2	3	4	5
АлАТ, Ед/л	17,77±3,48	21,44±6,06 p0=0,001	28,80±9,66 p0=0,001	33,86±9,55 p0=0,001	50,45±14,69 p0=0,001 p1=0,002 p2=0,032 p3=0,001	74,20±9,45 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,001 p3=0,001
АсАТ, Ед/л	21,96±4,63	28,02±4,30	45,71±10,94 p0=0,015 p1=0,015	58,85±12,36 p0=0,008 p1=0,002	125,08±11,27 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,001 p3=0,001	223,93±14,31 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,001 p3=0,001 p4=0,001
Коэффициент де Ритиса (АсАТ/АлАТ) усл. ед.	1,22±0,22	1,35±0,21	1,66±0,29 p0=0,001	1,82±0,11 p0=0,008 p1=0,002	2,47±0,21 p0=0,001 p1=0,012 p2=0,031 p3=0,001	3,22±0,55 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,021 p3=0,031 p4=0,001
ГГТ, Ед/л	12,90±2,73	31,61±3,79 p0=0,001	42,46±4,67 p0=0,015	56,14±5,29 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,001	70,95±13,80 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,001 p3=0,001	171,07±15,07 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,001 p3=0,001 p4=0,001
ЩФ, Ед/л	136,74±11,18	139,91±8,58	141,54±14,98	170,19±19,46 p1=0,027	221,16±22,12 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,001	292,20±11,22 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,012 p4=0,003
Альбумин, г/л	48,95±6,35	45,31±5,18	44,75±7,25	43,98±4,30	37,45±3,15 p0=0,004 p1=0,025 p3=0,044	33,48±4,79 p0=0,002 p1=0,012 p2=0,047 p3=0,020
СРБ, мг/л	2,62±1,02	2,72±1,28	2,92±1,48	2,56±1,02	4,05±2,36 p0=0,046 p1=0,001 p3=0,001	4,20±1,26 p0=0,013 p1=0,03 p3=0,011

Общий билирубин, мкМоль/л	11,18±2,17	12,24±1,87	11,76±1,90	12,35±2,66	24,81±3,46	29,75±5,89
					p0=0,001	p0=0,001
					p1=0,001	p1=0,001
					p2=0,001	p2=0,001
					p3=0,002	p3=0,001

Примечание: здесь и в **таблицах 5-7** - $p_0 - p_4$ – уровни значимости по сравнению с группами 0 – 5 соответственно.

Значения коэффициента де Ритиса значимо отличались от аналогичных значений условно здоровых доноров уже на начальных стадиях фиброза, достигая максимальных значений у пациентов с циррозом (IV ст.) (коэффициент регрессии $r^2 = 0,652$, $p < 0,05$) (таблица 4).

Содержание альбумина в сыворотке крови условно здоровых доноров и пациентов (без АФП), злоупотребляющих алкоголем, составило $48,95 \pm 6,35$ и $45,31 \pm 5,18$ г/л, соответственно (таблица 4). У пациентов с АФП на ранних стадиях фиброза (I и II) исследуемый показатель варьировал в пределах контрольных и референтных значений, тогда как у пациентов, злоупотребляющих алкоголем, на терминальных стадиях процесса – значимо снижался, относительно значений условно здоровых доноров и группы сравнения (таблица 4).

Концентрация С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови условно здоровых доноров и пациентов группы сравнения, злоупотребляющих алкоголем, была равной $2,62 \pm 1,02$ и $2,72 \pm 1,28$ мг/л, соответственно. У больных АФП содержание СРБ значимо изменялось только на начальной и умеренной стадиях фиброза (таблица 4), значимо превышая аналогичные значения контроля и группы сравнения ($p < 0,05$).

Показатель общего билирубина в сыворотке условно здоровых доноров был равным $11,18 \pm 2,17$ мкМоль/л. В группе сравнения (без АФП) у пациентов с I и II ст. фиброза исследуемый показатель был сопоставим с контрольными и референтными цифрами. Сывороточный уровень общего билирубина значимо возрастал (относительно контроля и группы сравнения) только у пациентов с терминальными (III и IV) стадиями фиброза (таблица 4).

3.2. Оценка содержания молекул внутриклеточного матрикса в сыворотке крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса

Классическим способом определения стадии фиброза печени является биопсия печени с гистологической оценкой полученного материала; однако этот инвазивный метод имеет ряд серьезных ограничений и недостатков (Lykiardopoulos V. et al., 2016). В последнее время внимание специалистов направлено на поиск альтернативных высокоэффективных мало- или неинвазивных методов оценки стадий фиброза печени, основанных на анализе структурных и функциональных изменений органа, приводящих к дисрегуляции обменных процессов между гепатоцитами и синусоидами (Lykiardopoulos V. et al., 2016).

Уровень тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы-1 (TIMP-1) в сыворотке крови условно здоровых доноров и группы сравнения был равным 256,4(227,5-265,5) и 245,2(255,6-258,3) нг/мл. Его значения были сопоставимы с аналогичными параметрами пациентов с АФП с I-ой стадией. Достоверное увеличение (в сравнении с контролем и группой сравнения) исследуемого показателя наблюдалось у пациентов с АФП, начиная со II стадии ($p < 0,05$) и достигало максимальных значений у больных АФП с IV стадией фиброза (таблица 5).

Содержание коллагена IV типа в сыворотке крови условно здоровых доноров и группы сравнения было, в целом, сопоставимым и было равным 90,4 (89,3-95,4) и 95,4(88,2-98,3) нг/мл, соответственно. Достоверный рост исследуемого показателя (в сравнении с контролем и группой сравнения) регистрировался у всех пациентов с АФП, также достигая максимума у больных АФП с IV стадией ($p < 0,05$) (таблица 5).

У условно здоровых доноров и группы сравнения содержание гиалуроновой кислоты (ГК) в сыворотке крови составило 21,4(19,3-25,4) и 20,4(18,0-21,5) нг/мл, соответственно. Уровень исследуемого анализа достоверно возрастал (в сравнении с контролем и группой сравнения) уже на I-ой стадии фиброза печени. Наиболее высокие значения исследуемого показателя регистрировались на терминальной (IV) стадии фиброза ($p < 0,05$) (таблица 5).

По результатам проведенного исследования, уровень N-терминального пептида проколлагена III типа (P-III-NP) в сыворотке крови здоровых доноров и лиц

группы сравнения (без АФП) был равен 3,81(3,85-4,12) и 3,53 (2,81-4,14) нг/мл, соответственно. У больных АФП данный показатель достоверно возрастал, также достигая максимальных значений на IV стадии фиброзного процесса ($p < 0,05$) (таблица 5).

Таблица 5. Содержание молекул внеклеточного матрикса в сыворотке крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса (Me (Q₁-Q₃))

Показатели, ед. изм.	Характеристика обследованных					
	Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I ст. n=33	II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
	0	1	2	3	4	5
Коллаген IV типа, нг/мл	90,4 (89,3-95,4)	95,4 (88,2-98,3)	105,8 (90,9-110,90) p0=0,048	129,9 (123,9-132,8) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002	154,8 (145,8-165,9) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,002	290,3 (277,4-311,5) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,002 p4=0,002
ГК, нг/мл	21,4 (19,3-21,6)	20,4 (18,0-21,5)	25,1 (23,7-27,4) p0=0,035 p1=0,035	37,3 (33,3-38,3) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002	68,4 (60,4-70,4) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,002	132,3 (129,4-145,4) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,002 p4=0,002
Р-III-NP, нг/мл	3,81(3,85-4,12)	3,53 (2,81-4,14)	6,55 (6,33-6,81) p0=0,002 p1=0,004	8,52 (7,91-9,08) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002	12,0 (10,0-13,2) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,002	26,91 (24,5-28,4) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,002 p4=0,002
TIMP-1, нг/мл	256,4 (227,5-265,5)	245,2 (255,6-258,3)	226,4 (256,5-278,3)	321,4 (290,4-332,4) p0=0,002 p1=0,003 p2=0,003	355,4 (324,5-378,5) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,048	489,3 (423,8-525,9) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,002 p4=0,002

Согласно результатам проведенного регрессионного анализа, содержание TIMP-1, коллагена IV типа и ГК, определяемое в сыворотке крови у больных АФП было ассоциировано со стадией фибротического процесса (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,983$; $r^2 = 0,736$; $r^2 = 0,889$, $p < 0,05$ во всех случаях); достоверных взаимосвязей между сывороточным содержанием P-III-NP и стадиями фиброза у обследованных лиц с хроническим потреблением алкоголя установлено не было.

3.3. Оценка уровня факторов с про- (IL-6, IL-8, TNF α , лептин) и противовоспалительным (IL-10, TGF- β 1, адипонектин) в сыворотке/плазме крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса

Уровень IL-6 в сыворотке периферической крови условно здоровых доноров был равным 1,81 (1,41-2,19) пг/мл. Результаты, полученные у лиц, злоупотребляющих алкоголем без АФП и у больных АФП с I - III ст. фиброза были сопоставимы с контрольными (таблица 6). Увеличение изучаемого показателя регистрировалось только на терминальной (IV) стадии фиброза, значимо превышая аналогичные параметры контроля и группы сравнения (таблица 6).

В группе условно здоровых доноров и у лиц группы сравнения (без АФП) концентрация IL-8 в сыворотке периферической крови была сопоставимой, составляя 4,40 (3,28-5,48) и 4,36(4,31-5,54) пг/мл, соответственно (таблица 6). У больных АФП данный показатель достоверно возрастал уже на начальных стадиях фиброза, достигая максимальных значений на терминальной (IV) стадии фиброзного процесса ($p < 0,05$) (таблица 6).

Согласно представленным нами данным, содержание TNF α в сыворотке, полученной от условно здоровых доноров было равным 3,29(3,09-4,02) пг/мл. Сывороточный уровень исследуемого анализа в группе сравнения (без АФП) значимо превосходил контрольные цифры (в среднем, в 1,6 раза) (таблица 6). Статистически достоверное повышение (по сравнению с контролем и группой сравнения) ($p < 0,05$) концентрации TNF- α в сыворотке крови регистрировалось у всех больных АФП (таблица 6).

Уровень трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1) в сыворотке крови условно здоровых доноров был сопоставим со значениями лиц группы сравнения,

составляя 21,90(19,50-24,40) и 25,48(19,21-29,31) пг/мл, соответственно. Достоверное повышение (в среднем в 2,7 раза) TGF- β 1 в сыворотке крови пациентов с АФП, злоупотребляющих алкоголем, регистрировалось только на продвинутых (III и IV) стадиях фиброза ($p < 0,05$) (таблица 6).

Таблица 6. Содержание (пг/мл) про- и противовоспалительных медиаторов в сыворотке периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса ($\bar{X} \pm m$, Me (Q1 - Q3))

Показатели, ед. изм.	Характеристика обследованных					
	Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I ст. n=33	II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
	0	1	2	3	4	5
IL-6, пг/мл	1,81 (1,41-2,19)	2,20 (1,89-3,11)	2,45 (2,09-3,11)	2,22 (2,10-3,28)	2,28 (2,22-4,39)	6,58 (4,38-9,29) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p4=0,013
IL-8, пг/мл	4,40 (3,28-5,48)	4,36 (4,31-5,54)	6,31 (5,40-8,39) p0=0,025 p1=0,018	19,49 (13,28-21,38) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002	26,39 (19,24-31,48) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002	38,91 (29,01-43,53) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,002 p4=0,018
TNF α , пг/мл	3,29 (3,09-4,02)	5,22 (3,37-5,49) p0=0,04	15,38 (10,39-18,39) p0=0,002 p1=0,002	29,38 (19,03-34,38) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,005	22,30 (18,32-26,59) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,003	36,87 (29,22-45,38) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,048 p4=0,018
IL-10, пг/мл	6,32 (5,49-7,15)	5,40 (4,39-7,49)	9,22 (7,28-11,09) p0=0,013 p1=0,009	8,11 (6,23-9,38) p0=0,001 p1=0,025	8,29 (6,48-9,11) p0=0,025 p1=0,009	13,32 (10,29-15,38) p0=0,002 p1=0,002 p2=0,025 p3=0,006 p4=0,006

TGFβ1, пг/мл	21,90 (19,50-24,40)	25,48 (19,21-29,31)	26,11 (21,30-29,28)	24,31 (23,13-27,39) p0=0,003 p1=0,009 p2=0,006	55,43 (40,23-58,87) p0=0,002 p1=0,002 p3=0,002	63,21 (47,48-65,47) p0=0,001 p1=0,004 p3=0,003
--------------	------------------------	------------------------	------------------------	--	--	--

В сыворотке периферической крови, полученной от условно здоровых доноров содержание противовоспалительного цитокина IL-10 было равным 6,32 (5,49-7,15) пг/мл, аналогичные показатели группы сравнения не отличались от контрольных составили 5,40(4,39-7,49) пг/мл. Значимое увеличение (по сравнению с контролем и группой сравнения) содержания IL-10 в сыворотке крови больных АФП было установлено на всех стадиях фиброза (таблица 6). Нами была обнаружена положительная взаимосвязь сывороточного содержания изучаемых медиаторов (IL-8 и TNFα) со стадией фиброза печени (коэффициент регрессии $r^2=0,871$ и $r^2=0,931$, $p < 0,05$). У обследованных нами пациентов с АПФ с терминальной стадии фиброза была выявлена позитивная корреляция IL-6 с TNFα и IL-8 ($r=0,782$, $r=0,924$, $p < 0,05$), а также негативная между IL-10 и СРБ ($r= - 0,586$, $p < 0,05$).

Плазменная концентрация лептина у условно здоровых доноров и пациентов группы сравнения лептина периферической крови, в целом, имела сопоставимые значения и была равной 15,39 (15,23-16,38) и 14,90 (14,30-15,38) пг/мл, соответственно (таблица 7).

У больных АФП значимое повышение исследуемого показателя (относительно контроля и группы сравнения) регистрировалось уже на начальных стадиях фиброза, достигая своего максимума на терминальной стадии процесса (таблица 7).

Содержание адипонектина в плазме периферической крови условно здоровых доноров было равным 13,28 (11,43-14,27) пг/мл, тогда как у лиц группы сравнения (без АФП) значения исследуемого показателя составили - 13,28 (11,43-14,27) пг/мл. У больных АФП, независимо от стадии фиброза, регистрировалось достоверное снижение плазменного содержания адипонектина (таблица 7).

Результаты регрессионного анализа позволили продемонстрировать положительную зависимость уровня лептина со стадией фиброза (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,638$; $p < 0,05$) и отрицательную - между плазменным содержанием адипонектина со стадией фибротического процесса ($r^2 = - 0,781$, $p < 0,05$).

Таблица 7. Содержание (пг/мл) адипокинов (лептина и адипонектина) в плазме периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса (Me (Q1 - Q3))

Показатели, ед. изм.	Характеристика обследованных					
	Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I ст. n=33	II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
	0	1	2	3	4	5
Лептин, пг/мл	15,39 (15,23-16,31)	14,90 (14,30-15,38)	18,39 (16,35-18,40) $p_0=0,003$ $p_1=0,004$	24,32 (21,39-25,32) $p_0=0,002$ $p_1=0,002$ $p_2=0,002$	23,10 (21,10-29,30) $p_0=0,002$ $p_1=0,002$ $p_2=0,002$	52,40 (49,39-58,49) $p_0=0,002$ $p_1=0,002$ $p_2=0,002$ $p_3=0,002$ $p_4=0,002$
Адипонектин, пг/мл	13,28 (11,43-14,27)	12,46 (11,38-15,38)	9,76 (8,65-10,48) $p_0=0,004$	8,59 (7,49-9,43) $p_0=0,003$ $p_1=0,003$	5,33 (4,38-5,48) $p_0=0,002$ $p_1=0,002$ $p_2=0,002$ $p_3=0,002$	4,99 (4,30-6,30) $p_0=0,002$ $p_1=0,002$ $p_2=0,002$ $p_3=0,002$

3.4. Оценка основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса

В виду отсутствия достоверных различий между тестируемыми параметрами, отражающими субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови у групп с начальной (I) и умеренной (II) стадиями фиброза, явилось целесообразным их объединение в одну группу.

Согласно представленным результатам, общее количество лейкоцитов в периферической крови условно здоровых доноров и пациентов группы сравнения было равным $5,79 \pm 0,78$ и $5,83 \pm 0,67 \cdot 10^9/\text{л}$. У больных АФП, независимо от стадии

фиброза, исследуемый показатель был сопоставим со значениями контроля и группы сравнения (таблица 8).

В образцах лизированной периферической крови условно здоровых доноров относительное и абсолютное содержание лимфоцитов составило $2,81 \pm 0,13 \cdot 10^9/\text{л}$ и 36,63 (34,59 – 38,91) %; Т-лимфоцитов ($\text{CD}45^+\text{CD}3^+$) - $1,85 \pm 0,41 \cdot 10^9/\text{л}$ и 77,43(72,56-78,87)%; Т-хелперов ($\text{CD}45^+\text{CD}3^+\text{CD}4^+$) – $0,94 \pm 0,14 \cdot 10^9/\text{л}$ и 48,62(43,11 – 48,98)%, соответственно. Исследуемые показатели в группе сравнения (без АФП) и у пациентов с АФП на начальных и умеренной стадиях фиброза были сопоставимы со значениями условно здоровых доноров (таблица 8).

Следует отметить, что достоверное снижение (в сравнении с контролем и группой хронических алкоголиков без АБП) содержания лимфоцитов регистрировалось только у больных АФП с III ст. (*относительного*) и у больных циррозом (*абсолютного и относительного*) (таблица 8).

Нами была установлена *общая* негативная корреляция ($r = -0,783$, $p = 0,031$) между относительным содержанием лимфоцитов и ст. фиброза у больных АФП.

У обследованных нами пациентов с АФП на начальных и умеренных (I-II) ст. фиброза, содержание (относительное) $\text{CD}3^+\text{CD}8^+$ лимфоцитов было значительно выше соответствующих показателей здоровых доноров и лиц, не имеющих структурных и функциональных нарушений печени (таблица 2), тогда как на более продвинутых стадиях заболевания регистрировалось значительное снижение абсолютного и относительного их содержания (таблица 8). Аналогичные изменения в группе больных АФП регистрировались при анализе содержания общего числа Т-лимфоцитов ($\text{CD}45^+\text{CD}3^+$) и субпопуляции Т-хелперов ($\text{CD}45^+\text{CD}3^+\text{CD}4^+$) (таблица 8) в образцах лизированной периферической крови (таблица 8).

Значения индекса иммунорегуляции ($\text{CD}4/\text{CD}8$) у условно здоровых доноров и лиц группы сравнения были сопоставимыми и составляли - 1,63 (1,58 – 1,72) и 1,51 (1,49 – 1,59) усл. ед. (таблица 8). 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 (таблица 8). Абсолютное и относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов

(CD45⁺CD3⁺CD8⁺) в периферической крови у условно здоровых доноров и лиц группы сравнения, злоупотребляющих алкоголем, было равным 0,78(0,76 – 0,83) и 0,75 (0,73 – 0,79) 10⁹/л и 29,91 (26,49 – 31,12) и 30,01 (29,19 – 32,10) %, соответственно (таблица 8).

Таблица 8. Общее количество лейкоцитов (10⁹/л), абсолютное и относительное содержание лимфоцитов и основных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса ($\bar{X} \pm m$, Me (Q1 - Q3))

Показатели, ед. изм.		Характеристика обследованных				
		Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I-II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
		0	1	2	3	4
Общее количество лейкоцитов	10 ⁹ /л	5,79±0,78	5,83±0,67	5,96±0,35	6,29±1,16	6,55±1,85
	Лимфоциты					
Лимфоциты	10 ⁹ /л	2,81±0,13	2,69±0,24	2,74±0,15	2,69±0,31	1,55±0,53 p0 = 0,011 p1 = 0,016 p2 = 0,029 p3 = 0,041
	%	36,63 (34,59 – 38,91)	34,22 (33,20 – 37,54)	36,43 (35,11-37,92)	30,91 (29,10-34,32) p0 = 0,015 p1 = 0,021 p2 = 0,034	26,11 (25,49- 27,91) p0 = 0,045 p1 = 0,024 p2 = 0,031 p3 = 0,047
CD45 ⁺ CD3 ⁺	10 ⁹ /л	1,85±0,41	1,76±0,32	1,85±0,61	1,78±0,24	1,24±0,31 p0 = 0,028 p1 = 0,025 p2 = 0,039 p3 = 0,021
	%	77,43 (72,56-78,87)	74,12 (70,21 – 76,38)	75,08 (72,34 - 77,34)	63,01 (62,12-66,37) p0 = 0,026 p1 = 0,038 p2 = 0,024	61,92 (59,12 - 62,96) p0 = 0,034 p1 = 0,019 p2 = 0,042 p3 = 0,038
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺	10 ⁹ /л	0,94±0,14	0,83±0,11	0,87±0,12	0,88±0,09	0,58±0,02 p0 = 0,045 p1 = 0,034 p2 = 0,031 p3 = 0,048
	%	48,62	45,38	46,81	43,09	38,72

		(43,11 – 48,98)	(42,98 – 47,38)	(46,20-49,01)	(36,29-44,29) p0 = 0,032 p1 = 0,016 p2 = 0,045	(32,39 - 39,24) p0 = 0,020 p1 = 0,017 p2 = 0,031 p3 = 0,023
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	10 ⁹ /л	0,78 (0,76 – 0,83)	0,75 (0,73 – 0,79)	0,82 (0,79 – 0,84)	0,65 (0,63 – 0,68) p0 = 0,039 p1 = 0,041 p2 = 0,046	0,54 (0,51 – 0,56) p0 = 0,045 p1 = 0,027 p2 = 0,034 p3 = 0,048
	%	29,91 (26,49 – 31,12)	30,01 (29,19-32,10)	32,35 (31,93-36,29) p0 = 0,021 p1 = 0,044	21,39 (20,32-23,49) p0 = 0,028 p1 = 0,030 p2 = 0,017	20,42 (18,39-24,21) p0 = 0,032 p1 = 0,021 p2 = 0,042
Индекс иммуноре- гуляции (CD4/CD8)		1,63 (1,58 – 1,72)	1,51 (1,49 – 1,59)	1,48 (1,44 – 1,52)	1,89 (1,71 – 1,92) p0 = 0,033 p1 = 0,045 p2 = 0,047	1,91 (1,87 – 1,94) p0 = 0,015 p1 = 0,023 p2 = 0,046

Примечание: здесь и в **таблицах 9-15** - $p_0 - p_3$ – уровни значимости по сравнению с группами 0 – 4 соответственно.

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 (таблица 8), тогда как на более продвинутых стадиях заболевания, регистрировалось значительное снижение абсолютного и относительного их содержания (таблица 8).

В образцах лизированной периферической крови условно здоровых доноров относительное и абсолютное число (от общего содержания CD3⁺CD4⁺ Т-клеток) Т-регуляторных клеток (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) составило 0,032 (0,031 – 0,042) 10⁹/л и 3,45 (3,21 – 4,18) %. Содержание CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ клеток у обследованных нами больных АФП с I-II ст. не отличалось от контроля и группы сравнения, значительно повышаясь (относительное и абсолютное содержание) у пациентов с продвинутыми стадиями фиброза ($p < 0,05$) (таблица 9).

В группе условно здоровых доноров содержание (абсолютное и относительное) NK-клеток ($CD45^+CD3^-CD16^+CD56^+$) в периферической крови было равным $0,24 \pm 0,03 \cdot 10^9/\text{л}$ и $10,21$ ($8,22 - 11,11$) %, соответственно (таблица 10).

Относительное содержание NK-клеток у лиц группы сравнения достоверно превышало результаты контрольной, тогда как их абсолютное число было сопоставимым с нормой (таблица 10).

Таблица 9. Абсолютное и относительное содержание (от общего содержания $CD3^+CD4^+$ Т-клеток) Т регуляторных клеток ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$) в периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса ($\bar{X} \pm m$, Me (Q1 - Q3))

Показатели, ед. изм.		Характеристика обследованных				
		Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I-II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
		0	1	2	3	4
$CD45^+CD3^+CD4^+$	$10^9/\text{л}$	$0,94 \pm 0,14$	$0,83 \pm 0,11$	$0,87 \pm 0,12$	$0,88 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,02$ p0 = 0,045 p1 = 0,034 p2 = 0,031 p3 = 0,048
	%	48,62 (43,11 - 48,98)	45,38 (42,98 - 47,38)	46,81 (46,20-49,01)	43,09 (36,29-44,29) p0 = 0,032 p1 = 0,016 p2 = 0,045	38,72 (32,39 - 39,24) p0 = 0,020 p1 = 0,017 p2 = 0,031 p3 = 0,023
$CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^{++}$	$10^9/\text{л}$	0,032 (0,031 - 0,042)	0,029 (0,027 - 0,039)	0,036 (0,034 - 0,047)	0,083 (0,076 - 0,089) p0 = 0,01 p1 = 0,001 p2 = 0,001	0,081 (0,080 - 0,084) p0 = 0,001 p1 = 0,023 p2 = 0,002
	%	3,45 (3,21 - 4,18)	3,28 (2,92 - 4,21)	5,18 (4,28 - 6,02)	9,22 (8,92 - 10,15) p0 = 0,001 p1 = 0,021 p2 = 0,013	13,09 (12,38 - 14,21) p0 = 0,001 p1 = 0,001 p2 = 0,032 p3 = 0,002

У больных АФП с I - II ст. фиброза относительное содержание $CD3^-CD16^+CD56^+$ 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, без изменения абсолютного их содержания (таблица 10).

Таблица. Абсолютное и относительное содержание НК-клеток ($CD3^+CD16^+CD56^+$) в периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса ($\bar{X} \pm m$, Me (Q1 - Q3))

Показатели, ед. изм.		Характеристика обследованных				
		Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I-II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
		0	1	2	3	4
Лимфоциты	10 ⁹ /л	2,81±0,13	2,69±0,24	2,74±0,15	2,69±0,31	1,55±0,53 p0 = 0,011 p1 = 0,016 p2 = 0,029 p3 = 0,041
	%	36,63 (34,59-38,91)	34,22 (33,20-37,54)	36,43 (35,11-37,92)	30,91 (29,10-34,32) p0 = 0,015 p1 = 0,021 p2 = 0,034	26,11 (25,49- 27,91) p0 = 0,045 p1 = 0,024 p2 = 0,031 p3 = 0,047
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10 ⁹ /л	0,24±0,03	0,22±0,02	0,23±0,05	0,24±0,06	0,21±0,08
	%	10,21 (8,22-11,11)	15,01 (14,09 – 17,72) p0 = 0,038	15,21 (14,23 – 17,37) p0 = 0,38	8,04 (7,93 – 8,35) p0 = 0,034 p1 = 0,029 p2 = 0,047	7,15 (6,91 – 7,76) p0 = 0,028 p1 = 0,016 p2 = 0,021

У обследованных нами лиц, представляющих группу условно здоровых доноров, абсолютное и относительное число В-клеток ($CD45^+CD3^+CD19^+$) было равным $0,43 \pm 0,04$ 10⁹/л и 15,72(14,39 – 16,01) %, соответственно. Исследуемые параметры лиц группы сравнения, злоупотребляющих алкоголем, были сопоставимы с контрольными цифрами (таблица 11).

У больных, страдающих хроническим алкоголизмом, на начальных и умеренных ст. фиброза печени, содержание (*относительное и абсолютное*) В-клеток ($CD3^+CD19^+$) 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 (таблица 11).

Таблица 11. Абсолютное и относительное содержание В-клеток ($CD45^+CD3^-CD19^+$) в периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса ($\bar{X} \pm m$, Me (Q1 - Q3))

Показатели, ед. изм.		Характеристика обследованных				
		Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I-II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
		0	1	2	3	4
Лимфоциты	$10^9/л$	2,81±0,13	2,69±0,24	2,74±0,15	2,69±0,31	1,55±0,53 p0 = 0,011 p1 = 0,016 p2 = 0,029 p3 = 0,041
	%	36,63 (34,59 – 38,91)	34,22 (33,20 – 37,54)	36,43 (35,11 – 37,92)	30,91 (29,10- 34,32) p0 = 0,015 p1 = 0,021 p2 = 0,034	26,11 (25,49-27,91) p0 = 0,045 p1 = 0,024 p2 = 0,031 p3 = 0,047
$CD45^+CD3^-CD19^+$	$10^9/л$	0,43±0,04	0,41±0,8	0,44±0,03	0,41±0,11	0,34±0,05 p0 = 0,019 p1 = 0,026 p2 = 0,031 p3 = 0,023
	%	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) p0 = 0,034 p1 = 0,045 p2 = 0,037

3.5. Оценка содержания гемопоэтических клеток ($CD45^+ CD34^+ / CD133^+$) в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса

В виду отсутствия достоверных различий между тестируемыми параметрами, отражающими содержание гемопоэтических клеток в

периферической крови у групп с начальной (I) и умеренной (II) стадиями фиброза, явилось целесообразным их объединение в одну группу.

Результаты анализа содержания гемопоэтических клеток в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени представлены в таблице 12.

Таблица 12. Абсолютное и относительное содержание гемопоэтических клеток ($CD45^+ CD34^+ / CD133^+$) в периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса (Ме (Q1 - Q3))

Показатели, ед. изм.		Характеристика обследованных				
		Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I-II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
		0	1	2	3	4
Общее количество лейкоцитов	$10^9/l$	5,79±0,78	5,83±0,67	5,96±0,35	6,29±1,16	6,55±1,85
	$10^9/l$	0,054 (0,041 – 0,061)	0,059 (0,046 – 0,062)	0,123 (0,101 – 1,145) p0 = 0,030 p1 = 0,045	0,033 (0,029 – 0,038) p0 = 0,021 p1 = 0,035 p2 = 0,043	0,014 (0,005 – 0,021) p0 = 0,029 p1 = 0,018 p2 = 0,037 p3 = 0,015
$CD45^+ CD34^+$	%	1,92 (1,85 – 1,98)	2,35 (1,41 - 2,62) p0 = 0,035	4,45 (3,02 – 4,54) p0 = 0,041 p1 = 0,025	1,25 (1,18 – 1,35) p0 = 0,018 p1 = 0,029 p2 = 0,034	0,91 (0,87 – 0,95) p0 = 0,025 p1 = 0,048 p2 = 0,031 p3 = 0,044
	$10^9/l$	0,035 (0,029 – 0,041)	0,049 (0,034 – 0,056) p0 = 0,451	0,089 (0,076 – 0,101) p0 = 0,034 p1 = 0,029	0,032 (0,025 – 0,039) p0 = 0,021 p1 = 0,045 p2 = 0,048	0,011 (0,005 – 0,019) p0 = 0,016 p1 = 0,032 p2 = 0,044 p3 = 0,018
$CD45^+ CD133^+$	%	1,28 (1,23 – 1,32)	1,83 (1,79 – 1,87) p0 = 0,047	3,28 (3,08 – 3,85) p0 = 0,020 p1 = 0,044	1,21 (1,09 – 1,32) p0 = 0,039 p1 = 0,045 p2 = 0,030	0,72 (0,61 – 0,83) p0 = 0,023 p1 = 0,035 p2 = 0,031

						p3 = 0,048
--	--	--	--	--	--	------------

Согласно полученным результатам, абсолютное число CD45⁺CD34⁺/CD133⁺ клеток в образцах периферической крови условно здоровых доноров было равным 0,054 (0,041 – 0,061) и 0,035 (0,029 – 0,041) 10⁹/л, тогда как относительное их содержание составило 1,92 (1,85 – 1,98) и 1,28 (1,23 – 1,32) %, соответственно (таблица 12).

Аналогичные параметры лиц группы сравнения (без АФП), злоупотребляющих алкоголем варьировали в диапазоне контрольных значений (таблица 12). У больных хроническим алкоголизмом с АФП на терминальных ст. фиброза число (*абсолютное и относительное*) CD34 и CD133 позитивных клеток в образцах периферической крови значимо снижалось относительно результатов контроля и группы сравнения (таблица 12).

Содержание CD45⁺CD34⁺/CD133⁺ клеток в образцах периферической крови пациентов с АФП на начальных и умеренных ст. фиброза, значимо превышало контрольные цифры, в среднем в 2,5 раза, а также показатели группы сравнения (в среднем, в 1,4 раза) (таблица 12).

3.6. Оценка содержания наивных Т-клеток (Т_Н), Т-лимфоцитов центральной памяти (Т_{СМ}), Т-клеток эффекторной памяти (Т_{ЕМ}) и терминально-дифференцированных эффекторов (Т_{ЕМРА}) (%) в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса

В виду отсутствия достоверных различий между тестируемыми параметрами, отражающими содержание различных популяций Т-клеток памяти в периферической крови у групп с начальной (I) и умеренной (II) стадиями фиброза, явилось целесообразным их объединение в одну группу.

Результаты исследования абсолютного и относительного содержания Т-клеток, несущих маркеры наивных Т-клеток (Т_Н, CD3⁺CD62L⁺CD45R0⁻/RA⁺), Т-лимфоцитов центральной (Т_{СМ}, CD3⁺CD62L⁺CD45R0⁺) и эффекторной (Т_{ЕМ}, CD3⁺CD62L⁻CD45R0⁺) иммунной памяти, а также терминально-дифференцированных эффекторов, реэкспрессирующих высокомолекулярную

изоформу рецептора CD45 – CD45RA (T_{EMRA} , CD3⁺CD62L⁻CD45R0) в периферической крови больных АФП представлены в таблице 13.

Таблица 13. Абсолютное и относительное содержание наивных Т-клеток (T_N), Т-лимфоцитов центральной памяти (T_{CM}), Т-клеток эффекторной памяти (T_{EM}) и терминально-дифференцированных эффекторов (T_{EMRA}) в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса ($\bar{X} \pm m$, Me (Q1 - Q3))

Показатели, ед. изм.		Характеристика обследованных				
		Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I-II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
		0	1	2	3	4
Лимфоциты	10 ⁹ /л	2,81±0,13	2,69±0,24	2,74±0,15	2,69±0,31	1,55±0,53 p0 = 0,011 p1 = 0,016 p2 = 0,029 p3 = 0,041
T_N	10 ⁹ /л	1,29 (1,25 – 1,32)	1,02 (0,98 – 1,08) p0=0,01	0,88 (0,82 – 0,91) p0=0,021 p1=0,01	0,73 (0,69 – 0,78) p0=0,02 p1=0,001 p2=0,01	0,33 (0,29 – 0,37) p0=0,002 p1=0,01 p2=0,001 p3=0,02
T_N	%	45,78 (43,29 – 47,58)	38,01 (36,28 – 39,56) p0=0,01	31,43 (29,01 – 32,47) p0=0,023 p1=0,012	26,43 (24,39 – 27,10) p0=0,003 p1=0,001 p2=0,001	21,10 (19,33- 22,01) p0=0,001 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,001
T_{CM}	10 ⁹ /л	0,49 (0,45 – 0,52)	0,43 (0,39 – 0,46) p0=0,01	0,34 (0,32 – 0,37) p0=0,01 p1=0,01	0,25 (0,23 – 0,28) p0=0,001 p1=0,001 p2=0,001	0,13 (0,11 – 0,16) p0=0,001 p1=0,001 p2=0,001 p3=0,002
T_{CM}	%	17,30 (12,11 – 18,39)	16,53 (13,99 – 17,81)	12,48 (10,03 – 13,39) p0=0,001 p1=0,032	9,34 (8,83 – 9,87) p0=0,002 p1=0,003 p2=0,01	7,75 (6,92 – 8,02) p0=0,001 p1=0,002 p2=0,001 p3=0,001

T_{EM}	$10^9/л$	0,35 (0,32 – 0,37)	0,44 (0,41 – 0,48) $p_0=0,01$	0,52 (0,49 – 0,55) $p_0=0,01$ $p_1=0,01$	0,62 (0,58 – 0,67) $p_0=0,001$ $p_1=0,001$ $p_2=0,03$	0,47 (0,46 – 0,59) $p_0=0,001$ $p_2=0,002$ $p_3=0,003$
T_{EM}	%	12,33 (10,32 – 13,31)	15,39 (14,40 – 17,49) $p_0=0,012$	18,91 (17,78 – 21,49) $p_0=0,036$ $p_1=0,011$	23,09 (20,17 – 25,49) $p_0=0,01$ $p_1=0,001$ $p_2=0,012$	29,32 (26,49- 32,33) $p_0=0,001$ $p_1=0,001$ $p_2=0,001$ $p_3=0,001$
T_{EMRA}	$10^9/л$	0,15 (0,13 – 0,17)	0,23 (0,19 – 0,26)	0,36 (0,32 – 0,41)	0,54 (0,49 – 0,58)	0,49 (0,46 – 0,61) $p_0=0,001$ $p_1=0,002$ $p_2=0,001$
T_{EMRA}	%	5,23 (4,15 – 10,24)	8,42 (6,59 – 15,35) $p_0=0,003$	13,31 (12,24 – 18,03) $p_0=0,021$ $p_1=0,015$	19,73 (16,48 – 24,32) $p_0=0,021$ $p_1=0,001$ $p_2=0,032$	25,42 (22,01-32,03) $p_0=0,001$ $p_1=0,001$ $p_2=0,002$ $p_3=0,003$

В группе условно здоровых доноров абсолютное и относительное содержание T_N клеток было равным 1, 29 (1,25 – 1,32) $10^9/л$ и 45,78 (43,29 – 47,58) %, T_{CM} лимфоцитов - 0,49 (0,45 – 0,52) $10^9/л$ и 17,30 (12,11 – 16,39) %; T_{EM} - 0,35 (0,32 – 0,37) $10^9/л$ и 12,33 (10,32 – 13,31)%, T_{EMRA} - 0,15 (0,13 – 0,17) $10^9/л$ и 5,23 (4,15 – 10,24)%, соответственно (таблица 13). У категории больных без АФП абсолютное и относительное число эффекторов - T_{EM} и T_{EMRA} также превышало показатели контрольной группы, абсолютное число T_{CM} лимфоцитов было снижено, тогда как относительное содержание лимфоцитов не изменялось (регистрировалась тенденция к снижению), а относительное и абсолютное число наивных $T_{лимфоцитов}$ было значительно ниже нормы (таблица 13).

У всех больных АФП на разных стадиях развития патологического процесса регистрировалось достоверное увеличение процентного числа эффекторных T -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 (таблица 13). Следует отметить, что на фоне повышения относительного содержания эффекторных клеток (T_{EM} и T_{EMRA}), абсолютные их значения у

больных, злоупотребляющих алкоголем, циррозом были снижены в связи с лимфопенией.

Результаты проведенного нами регрессионного анализа позволили продемонстрировать положительную зависимость содержания T_{EMRA} у больных АФП со стадией фиброза (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,831$; $p < 0,05$) и отрицательную с числом наивных Т-клеток (коэффициент регрессии: $r^2 = - 0,761$; $p < 0,05$). У лиц, злоупотребляющих алкоголем без АБП также были обнаружены негативные ассоциации между числом T_N с T_{EM} ($r = -0,522$, $p < 0,05$) и T_{CM} с T_{EM} ($r = -0,391$; $p < 0,05$).

3.7. Оценка содержания моноцитов в периферической крови и их кислородзависимой бактерицидности в НСТ-тесте у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса

В виду отсутствия достоверных различий между тестируемыми параметрами, отражающими содержание моноцитов в периферической крови, а также результатов НСТ-теста у групп с начальной (I) и умеренной (II) стадиями фиброза, явилось целесообразным их объединение в одну группу.

У обследованной нами группы условно здоровых доноров, абсолютное и относительное число моноцитов ($CD45^+CD3^-CD14^+$) было равным 0,19 (0,17-0,26) $10^9/л$ и 3,26 (2,98-4,39) %, соответственно. Исследуемые параметры лиц группы сравнения (без АФП), злоупотребляющих алкоголем, были сопоставимы с контрольными цифрами (таблица 14).

Содержание (относительное и абсолютное) моноцитов ($CD45^+CD3^-CD14^+$) в крови у больных АФП на начальных и умеренных (I - II) ст. фиброза печени было сопоставимым с показателями контроля и группы сравнения, тогда как у больных АФП с III ст. фиброза печени и циррозом (IV ст.), напротив, регистрировалось значимое увеличение количества $CD45^+CD3^-CD14^+$ клеток. Следует отметить, что абсолютное число моноцитов в периферической крови у больных алкоголизмом положительно коррелировало со стадией фиброза печени ($r = 0,871$, $p < 0,05$).

Параметры индуцированного и спонтанного НСТ-теста моноцитов в группе здоровых доноров были равны $8,22 \pm 0,42\%$ и $29,01 \pm 2,11\%$, соответственно (таблица

15). В группе сравнения (без АФП) значения спонтанного и стимулированного пирогеалом НСТ-теста моноцитов превышали (в среднем, в 1,8 и 1,3 раза) контрольные цифры ($p < 0,05$) (таблица 15).

Таблица 14. Абсолютное и относительное содержание моноцитов ($CD45^+CD3^-CD14^+$) в периферической крови у больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса ($\bar{X} \pm m$, Me (Q1 - Q3))

Показатели, ед. изм.		Характеристика обследованных				
		Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I-II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
		0	1	2	3	4
Общее количество лейкоцитов	10 ⁹ /л	5,79±0,78	5,83±0,67	5,96±0,35	6,29±1,16	6,55±1,85
	10 ⁹ /л	0,19 (0,17-0,26)	0,19 (0,18 – 0,26)	0,27 (0,21 – 0,35)	0,65 (0,42 – 0,76) p0=0,004 p1=0,001 p2=0,002	0,91 (0,62 – 1,09) p0=0,003 p1=0,002 p2=0,002 p3=0,003
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD14 ⁺	%	3,26 (2,98-4,39)	3,29 (2,96-4,17)	4,38 (3,29-5,36)	9,74 (6,49-10,79) p0=0,001 p1=0,002 p2=0,001	13,03 (9,65-15,22) p0=0,001 p1=0,002 p2=0,001 p3=0,001

Индекс стимуляции (отражающий отношение значений стимулированного НСТ-теста к значениям спонтанного) моноцитов у больных алкогольным фиброзом (I-IV ст.) был значительно ниже показателей условно здоровых доноров (таблица 15).

Таблица 15. Содержание диформазан-позитивных моноцитов в периферической крови больных алкогольным фиброзом печени на различных стадиях развития патологического процесса ($\bar{X} \pm m$)

Показатели, ед. изм.		Характеристика обследованных				
		Здоровые доноры n=20	Без АФП n=15	I-II ст. n=33	III ст. n=17	IV ст. n=12
		0	1	2	3	4
Базальный НСТ-тест	%	8,22±0,42	15,01±1,32 p0=0,004	22,1±2,08 p0=0,004 p1=0,002	31,15±1,05 p0=0,004 p1=0,001 p2=0,002	38,02±2,29 p0=0,004 p1=0,001 p2=0,001
Стимуляция пирогеналом	%	29,01±2,11	38,18±3,01 p0=0,004	53,9±5,01 p0=0,004 p1=0,001	35,3±2,1 p0=0,004 p1=0,001 p2=0,002	41,1±2,41 p0=0,027 p1=0,002 p2=0,004
Индекс стимуляции	усл. ед.	3,63±0,01	2,53±0,01 p0=0,004	2,32±0,02 p0=0,004	1,12±0,01 p0=0,004 p1=0,001 p2=0,002	1,07±0,01 p0=0,001 p1=0,001 p2=0,002

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполненного нами исследования выявлено, что у всех обследованных больных АПФ, злоупотребляющих алкоголем, регистрировались значимые изменения биохимических показателей (по сравнению с контролем и группой сравнения): повышение активности ферментов печени (АлАТ, АсАТ, ЩФ и ГГТ), ассоциированное со стадией фиброза, увеличение содержания общего билирубина (у пациентов с терминальными стадиями фиброза), снижение концентрации альбумина, повышение значений *коэффициента де Ритиса* на всех стадиях фиброза.

Установлено, что хроническое употребление этанола достоверно изменяет уровень молекул внеклеточного матрикса (TIMP-1, коллагена IV типа, ГК и P-III-NP) в сыворотке крови больных АФП. Факт обнаружения высокого уровня компонентов внеклеточного матрикса в крови может свидетельствовать о нарушении процессов обмена между гепатоцитами и синусоидами, способствуя развитию гипоксии ткани печени с вовлечением гепатоцитов в процесс фиброгенеза. Нами зарегистрирован достоверный рост уровня провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8 и TNF) в сыворотке крови. Выявлена прямая зависимость содержания медиаторов - IL-8 и TNF α в сыворотке крови больных АФП со стадией фиброза. В тоже время, регистрируемое нами повышение уровня противовоспалительных факторов IL-10 и TGF- β 1 на более продвинутых стадиях фиброза, может являться результатом компенсаторных механизмов, направленных на предотвращение острых иммунопатологических процессов. Проведенный нами анализ основных адипокинов (лептина, адипонектина) в плазме крови у больных АФП, позволил выявить их разнонаправленные изменения. Так, уровень лептина у больных АФП повышался при прогрессировании фиброза печени, тогда как уровень адипонектина, напротив, снижался, что может указывать на антифиброзные эффекты адипонектина и профиброзное действие лептина, лежащие в основе модуляции хронических воспалительных реакций при алкогольном фиброзе печени.

У больных АФП на терминальных стадиях фиброза выявлена значительная лимфопения с изменением состава основных субпопуляций лимфоцитов относительно значений условно здоровых доноров и группы сравнения. Установленные нами негативные взаимосвязи между содержанием НК-клеток и T-регуляторных клеток в периферической крови у больных с продвинутыми стадиями фиброза свидетельствуют об угнетающем влиянии T-регуляторных клеток в отношении популяции естественных киллеров, что может способствовать снижению их антифибротических эффектов.

Обнаруженное нами в крови больных АФП с терминальными стадиями заболевания снижение (относительно контроля и группы сравнения) относительного числа наивных (T_N) и T-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 T_N и T_{CM} лимфоцитов 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 стадиях 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 заболевания. Проведенное исследование позволило выявить, что у пациентов с АФП (независимо от стадии фиброза печени) показатели кислородзависимой бактерицидности (в НСТ-тесте) моноцитов значительно превышают аналогичные характеристики контроля (*за исключением индекса стимуляции*), что может свидетельствовать о значительном напряжении механизмов кислородзависимой биоцидной активности моноцитов при АФП, что обеспечивает реализацию их цитотоксического действия не только в отношении антигенных структур, но и клеток макроорганизма.

В целом, полученные нами данные демонстрируют новые аспекты иммунной регуляции процессов фиброгенеза при хроническом алкоголизме в контексте изучения морфофункциональных реакций систем крови.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хроническое употребление алкоголя является преобладающим этиологическим фактором в патогенезе хронических диффузных заболеваний печени, включая фиброз (Miller A.M. et al., 2011; Nagy L.E., 2015). В целом, заболевания печени алкогольного генеза клинически проявляются в виде алкогольной жировой дистрофии печени и алкогольного стеатогепатита/гепатита, что в дальнейшем может способствовать развитию цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (Li D. et al., 2018). Фиброз печени – тяжелая прогрессирующая патология с высоким уровнем летальных исходов (Li D. et al., 2018), индуцированный большинством гепатотоксических факторов, включая алкоголь, является результатом повторяющихся во времени процессов повреждения-восстановления клеток печеночной паренхимы – гепатоцитов, характеризуясь чрезмерным накоплением компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), что неизменно приводит к изменению структуры и функций органа (Higuchi H., Gores G.J., 2003; Li D. et al., 2018).

Патогенетическое влияние алкоголя на паренхиму печени ассоциировано, прежде всего, с первичным продуктом окисления этанола - ацетальдегидом и активацией микросомальной этанол-окисляющей системы (МЭОС) (Teschke R., 2018). Последняя опосредует ускорение метаболизма этанола в ацетальдегид, индуцирует активацию CYP2E1, а также усиливает продукцию активных форм кислорода (АФК), которые оказывают прямое и опосредованное повреждающее действие на паренхиматозные (гепатоциты) и непаренхиматозные (клетки Купфера, звездчатые клетки печени и синусоидальные эндотелиальные клетки) клетки печени (Teschke R., 2018). Кроме того, этанол за счет увеличения количества эндотоксинов, вырабатываемых кишечником, гипоксии (окислительного стресса) или образования токсических и профиброгенных метаболитов (например, ацетальдегида или пероксидов липидов), опосредует активацию и последующую трансформацию ЗКП (Jeong W.I., 2008).

В некоторых работах показано, что формирование цирроза при алкогольной болезни печени (АБП) может происходить путем прогрессирования фиброза, в отсутствие выраженного воспаления (Jeong W.I., 2008). В то же время выявлена

взаимосвязь воспаления с процессами фиброобразования в печени (Wang H.J. et al., 2012). Активация клеточных и гуморальных компонентов иммунитета при АБП является важным звеном фиброгенеза, опосредуя трансформацию покоящихся ЗКП в пространстве Диссе в пролиферирующие фибробластоидные клетки, продуцирующие компоненты ВКМ (Szuster-Ciesielska A. et al., 2009). В свою очередь, закрытие функциональных межклеточных пространств, вследствие накопления компонентов ВКМ, как уже упоминалось ранее, приводит к нарушению обменных процессов между гепатоцитами и синусоидами, способствуя развитию гипоксии ткани печени с вовлечением гепатоцитов в процесс фиброгенеза (Lieber C.S. et al., 2008).

Несмотря на наличие в современной литературе большого количества источников, освещающих участие этанола в патогенезе АБП, ключевые механизмы этанол-индуцированного фиброгенеза на сегодняшний день до конца не расшифрованы. В настоящем исследовании была предпринята попытка оценить особенности морфофункциональных характеристик крови у больных АБП, с изучением механизмов регуляции воспалительных и регенеративных реакций, возникающих в ответ на повреждение гепатоцитов с исходом в фиброз.

При проведении сравнительного анализа биохимических, гуморальных и клеточных параметров, регистрируемых в периферической крови, полученных у больных АФП на различных стадиях развития патологического процесса, группы сравнения (злоупотребляющие алкоголем без АФП) и у условно здоровых лиц в зависимости от гендерных критериев, достоверных различий тестируемых параметров выявлено не было.

У больных АФП, распределенных по стадиям фиброза, показатели, характеризующие ферментный состав сыворотки крови (АлАТ, АсАТ, ГГТ, ЩФ), коэффициент де Ритиса, общий билирубин, ожидаемо превосходили аналогичные значения условно здоровых доноров и группы сравнения (без АФП) (таблица 4). Следует отметить пониженный (по сравнению с контролем и группой сравнения) сывороточный уровень альбумина у больных АФП на терминальных стадиях фиброза (таблица 4). Нами выявлены положительные зависимости уровня активности ферментов АсАТ и ГГТ, а также значений коэффициента де Ритиса у больных АФП

со ст. фиброза (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,671$, $r^2 = 0,801$ и $r^2 = 0,652$, $p < 0,05$ соответственно).

Изменения биохимических показателей у лиц, злоупотребляющих алкоголем, в зависимости от наличия/отсутствия АБП широко представлены в литературе (Majhi S., 2006; Votros M., 2013; Torkadi P., 2014) и согласуются с полученными нами результатами. В частности, исследованиями других авторов установлено, что пациенты с АБП имеют более высокие уровни ферментов печени - ЩФ и ГГТ и высокое значение коэффициента де Ритиса (АсАТ / АлАТ > 2) по сравнению с контрольной группой, а также пациентами с неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) и острым вирусным гепатитом. Предполагают, что повышение значений коэффициента де Ритиса (>2) у пациентов с АБП может быть связано с вызванным алкоголем повреждением митохондрий печени и дефицитом пиридоксина (Majhi S., 2006; Votros M., 2013; Torkadi P., 2014).

Как уже упоминалось ранее, внимание специалистов направлено на поиск альтернативных высокоэффективных мало- или неинвазивных методов оценки стадий фиброза печени, основанных на анализе структурных и функциональных изменений органа (Lykiardopoulos V. et al., 2016). В частности, структурные изменения паренхимы печени, приводящие к ее функциональным нарушениям обусловлены избыточным осаждением коллагенов и других белков внеклеточной матрицы в тканях печени в результате дисбаланса между продукцией и последующей их деградацией матриксными металлопротеиназами (MMPs) (Li D. et al., 2018). Активность MMPs регулируется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMPs), в том числе TIMP-1 (Campbell S., 2001; Li J. et al., 2005).

Полученные нами результаты, относительно содержания TIMP-1 в крови больных АФП (таблица 5), находят отражение в исследованиях зарубежных авторов. Так, Campbell S. и др., (2001) установили сильные взаимосвязи сывороточных уровней TIMP-1 со стадиями фиброза, выявленными при проведении биопсии печени у пациентов с алкогольной зависимостью (Friedman S.L., Bansal M.V., 2006), что позволяет относить TIMP-1 к критическим детерминантам развития фиброза. Доказано, что процесс регрессии фиброза ассоциирован со снижением уровня TIMP-1 в крови, вследствие апоптотической

гибели активированных (Li J. et al., 2005; Friedman S.L., Bansal M. B., 2006; Lieber C.S. et al., 2008; Li D. et al., 2018). Кроме того, становится очевидным, что при повторных повреждениях печени процесс синтеза белков ВКМ становится интенсивнее, чем их клиренс, что в свою очередь, индуцирует прогрессирование фиброза (Li J. et al., 2005).

Концентрация TIMP-1 в крови отражает скорость метаболизма коллагена в печени, в частности, IV типа (компонент базальной мембраны), осаждение которого затрудняет проникновение метаболитов через синусоиды, опосредуя развитие капилляризации (Lykiardopoulos V. et al., 2016). Вышесказанное подтверждается выявленной нами общей сильной позитивной корреляцией между содержанием коллагена IV типа и TIMP-1 в сыворотке крови больных АФП (общая корреляция $r=0,98$, $p < 0,01$). Кроме того, содержание TIMP-1 и коллагена IV типа у больных алкогольным фиброзом печени было ассоциировано со стадией фибротического процесса (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,983$; $r^2 = 0,736$, $p < 0,05$ во всех случаях). Следует отметить, что определение коллагена IV в крови широко используется как параметр оценки противовирусной терапии при заболеваниях печени вирусной этиологии (Suda T. et al., 2017).

В свою очередь, ГК является главным компонентом ВКМ (Lieber C.S. et al., 2008). Обнаруженное нами повышение (в сравнении с контролем и группой сравнения) уровня ГК в сыворотке крови больных АФП (таблица 5), демонстрировало зависимость от стадии фибротического процесса (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,889$, $p < 0,05$), что также согласуется с данными научной периодики (Lieber C.S. et al., 2008). Установлено, что увеличение уровня ГК в крови при различных дегенеративных заболеваниях печени опосредовано снижением ее клиренса гепатоцитами и/или увеличением продукции ГК при воспалении (повреждении) печеночной ткани (Lieber C.S. et al., 2008). По данным Li J. et al. (2005), при экспериментальном (у крыс) токсическом гепатите, концентрация ГК в сыворотке крови является достоверным показателем морфологических и функциональных изменений в синусоидальных эндотелиальных клетках печени (Li J. et al., 2005). Кроме того, уровень ГК является ранним маркером токсического повреждения печени (т.к. - этанол, ацетаминофен, бактериальные

липополисахариды), поскольку патологические изменения синусоидальных эндотелиальных клеток предшествуют нарушению функций гепатоцитов (Gudowska M. et al., 2017). Таким образом, выявленные нами изменения концентрации ГК в сыворотке крови больных АФП, ассоциированные со стадией фиброза, могут быть связаны с повреждениями синусоидальных эндотелиальных клеток и нарушениями микроциркуляторного русла печени, развивающимися в результате хронического потребления алкоголя.

Следующий определяемый нами анализ, P-III-NP, метаболизируется синусоидальными клетками и отражает процесс синтеза коллагена в печени (Nøjgaard C. et al., 2003). P-III-NP достаточно давно известен в качестве сывороточного маркера фиброза печени (Teare J.P. et al., 1993; Nøjgaard C. et al., 2003; Rosenberg W. M. et al., 2004). Полученные нами результаты (таблица 5), характеризующие динамику изменения уровня изучаемой молекулы ВКМ в зависимости от стадии фиброза у больных АФП, однозначно свидетельствуют, что инактивация процесса деградации избыточного коллагена является важным условием для прогрессирования фиброза печени и развития цирроза (Campbell S. et al., 2001). Согласно данным литературы, высокие показатели уровня P-III-NP в крови при дегенеративных заболеваниях печени следует расценивать как прогностически неблагоприятные (Troctme C. et al., 2006).

Таким образом, хроническое потребление этанола достоверно изменяет уровень молекул ВКМ (в частности, TIMP-1, коллагена IV типа, ГК и P-III-NP), содержание которых в крови больных с АФП увеличивается с прогрессированием стадии фиброза печени (кроме P-III-NP). Исследуемые нами молекулы ВКМ могут быть потенциальными кандидатами для определения стадии алкогольного фиброза печени, с целью создания инструментов, необходимых для проведения диагностики, мониторинга лечения и прогностики заболевания.

Регуляция воспалительных реакций в ответ на повреждение гепатоцитов токсическими факторами осуществляется молекулами межклеточной кооперации – цитокинами, хемокинами, факторами роста и др., модулирующими процессы фиброгенеза *in vivo* (Kawaratani H. et al., 2013; Barr T. et al., 2016).

Как уже упоминалось ранее, длительный прием алкоголя способствует формированию этанол-индуцированного воспаления в печени, за счет активации этанолом и его метаболитами экспрессии ядерного фактора NF-κB и нисходящих путей Cox-1 и iNOs в клетках печени; как следствие, повышается транскрипция генов провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1β и др.), а также регистрируется усиление их секреции макрофагами и другими клетками печени (Wang H.J. et al., 2012; Kawaratani H. et al., 2013; Barr T. et al., 2016; Teschke R., 2018). У человека и экспериментальных животных обнаружены положительные корреляции сывороточных/плазменных уровней провоспалительных молекул (в частности, TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-3α и др.) с тяжестью острых и хронических заболеваний печени (Kawaratani H. et al., 2013).

Как уже упоминалось ранее, провоспалительные цитокины стимулируют трансформацию резидентных звездчатых клеток печени (ЗКП) в миофибробласты, продуцирующие компоненты ВКМ, с последующим их отложением/накоплением в пространстве Диссе, а также способствуют миграции иммунных клеток в очаг повреждения, приводя к усилению инфильтративного компонента воспаления, усугубляя повреждение паренхимы печени (Barr T. et al., 2016). Выявленное нами достоверное повышение (по сравнению с контролем и группой сравнения) концентрации TNF-α и IL-8 в сыворотке крови у больных АФП (таблица 6) коррелировало со стадией фиброза печени (коэффициент регрессии $r^2=0,871$ и $r^2=0,931$, $p < 0,05$). Полученные результаты вполне согласуются с данными литературы. Так, при хроническом злоупотреблении алкоголем выявлена повышенная продукция TNFα и IL-8 разными клетками, в т.ч. клетками Купфера, индуцированная бактериальными токсинами (ЛПС), проникающими в системную циркуляцию вследствие повышенной проницаемости кишечной стенки и снижения функциональной активности печени (Neuman M.G. et al., 2015). Опосредуемое IL-8 и TNFα усиление продукции АФК и оксида азота гепатоцитами, приводит к дальнейшему их повреждению, обуславливая картину полиорганной недостаточности при острой и хронической АБП (Kawaratani H. et al., 2013). В связи с вышесказанным, логичным явилось обнаружение у обследованных нами больных АФП положительной корреляции между уровнем TNFα и коэффициентом

де Ритиса (общая корреляция $r=0,899$, $p < 0,05$). Кроме того, хемокин IL-8 обеспечивает интенсивный приток иммунных клеток, в т.ч. нейтрофилов, в очаг повреждения (Neuman M.G. et al., 2015). Установлено, что IL-8 наряду с TNF α , опосредует активацию профиброгенных коллаген-продуцирующих ЗКП (Jaeschke H., 2002; Wieser V. et al., 2016). Подтверждением вышесказанному явились результаты корреляционного анализа, выявившего взаимосвязь между уровнем IL-8, TNF α и неинвазивными маркерами фиброза печени (общие корреляции IL-8 с P-III-NP $r = 0,578$, $p < 0,001$; TNF α с коллагеном IV типа $r=0,562$, $p < 0,05$, у больных АФП с III ст.фиброза: IL-8 с P-III-NP и ГК, $r = 0,617$, $r = 0,705$, $p < 0,05$, TNF α с коллагеном IV типа $r = 0,911$, $p < 0,05$, соответственно, у больных циррозом).

Согласно данным литературы, у больных АБП, наряду с повышенными уровнями провоспалительных факторов в циркуляции, регистрируется рост продукции цитокинов с гепатопротекторным (IL-6) и противовоспалительным (IL-10 и TGF- β 1) действием (Gao B., 2012; Wang H.G. et al., 2012; Nagy L. E., 2015; Li W. et al., 2017).

Роль IL-6 в патогенезе АБП сложна и не до конца выяснена. С одной стороны, доказано протекторное действие IL-6 на гепатоциты и участие этого цитокина в восстановлении митохондриальной ДНК клеток печени после ее алкогольного повреждения (Hong F. et al., 2002; Zhang X. et al., 2010). Выявлено также, что на ранней стадии АБП сигнальный путь IL-6 / STAT3 оказывает защитное действие в отношении развития алкогольного стеатоза и повреждения печеночной паренхимы (Gao B., 2005). С другой стороны, IL-6, стимулируя дифференцировку Th17-клеток, способствует этанол-индуцированному воспалению печени (Kawaratani H. et al., 2013). Подавление передачи сигналов IL-6 у мышей уменьшает воспаление печени, за счет снижения ее инфильтрации нейтрофилами и мононуклеарными клетками (Rabe B. et al., 2008). У обследованных нами пациентов с АПФ, достоверный рост IL-6 в сыворотке крови регистрировался только в терминальной стадии фиброза (таблица 6) и был ассоциирован с TNF α и IL-8 ($r=0,782$, $r=0,924$, $p < 0,05$), что позволяет относить IL-6 к провоспалительным цитокинам.

Трансформирующий фактор роста- β_1 (TGF- β_1) – мультифункциональный цитокин, является ключевой молекулой фиброгенеза печени у человека, способствуя увеличению синтеза клетками Ито компонентов ВКМ, замедляя его деградацию (Li W. et al., 2017). В свою очередь IL-10 является противовоспалительным цитокином, который *в норме* оказывает протекторное действие на гепатоциты, стимулируя их пролиферацию и предотвращая, в целом, развитие фиброза (Louis H. et al., 2003). Кроме того, КК, продуцируя IL-10 в ответ на стимуляцию ЛПС, подавляют секрецию провоспалительных факторов (TNF- α , IL-1 *a* и IL-6) активированными макрофагами / моноцитами (Kawaratani H. et al., 2013). В целом, IL-10 играет защитную роль на ранней стадии АФП, тогда как на более поздних этапах, супрессивное действие IL-10 способствует дальнейшей прогрессии заболевания.

Достоверное увеличение содержания TGF- β_1 в сыворотке крови пациентов с АФП (по сравнению с контролем и группой сравнения), злоупотребляющих алкоголем, регистрировалось только на продвинутых (III и IV) стадиях фиброза ($p < 0,05$), тогда как содержание IL-10 в сыворотке крови у больных АФП было повышено на всех стадиях фиброза (таблица 6).

Интересными оказались выявленные нами корреляции исследуемых медиаторов с молекулами ВКМ. Так, TGF- β_1 был положительно взаимосвязан с коллагеном IV типа (общая корреляция $r = 0,564$, $p < 0,05$; у больных АФП с IV стадией фиброза $r = 0,667$, $p < 0,05$), а IL-10 с ГК (общая корреляция $r = 0,776$, $p < 0,05$; у больных АФП с III и IV стадией фиброза $r = 0,521$ и $r = 0,701$, $p < 0,05$, соответственно). Кроме того, у обследованных нами больных АФП были обнаружены общие негативные корреляции между IL-10 и СРБ, TNF- α ($r = - 0,586$, $r = - 0,781$, $p < 0,05$).

Выявленные изменения, на наш взгляд, могут быть обусловлены универсальной реакцией иммунной системы, направленной на подавление избыточного системного воспаления, вследствие воздействия алкоголя.

Таким образом, хроническое злоупотребление алкоголем достоверно изменяет уровень провоспалительных факторов (в частности, IL-6, IL-8 и TNF α); содержание IL-8 и TNF α в крови больных с АФП увеличивается с

прогрессированием стадии фиброза печени. Рост сывороточного уровня цитокина с противоположным действием IL-10, также обнаруживается на всех стадиях фиброза, тогда как повышение TGF- β 1 - только на более продвинутых стадиях заболевания. Учитывая важную роль IL-10 и TGF- β 1 в запуске процессов фиброгенеза, можно предположить, что фиброз печеночной паренхимы, вследствие воздействия гепатотоксических факторов, может быть компенсаторным механизмом, направленным на предотвращение острых иммунопатологических процессов.

Длительное употребление алкоголя (этанола) способствует развитию дисфункции жировой ткани, нарушая липидный обмен (Wilkin R.J., 2016; Askgaard G., 2015). При длительном приеме алкоголя жирные кислоты, продуцируемые жировой тканью, транспортируются в печень и способствуют развитию стеатоза печени (Shen Z. et al., 2010). У лиц, злоупотребляющих алкоголем, уменьшение массы жировой ткани связано с увеличением степени жировой инфильтрации печени (Steiner J.L., Lang C.H., 2017; Gao B. et al., 2017).

В контексте рассматриваемой тематики следует отметить, что печень представляет собой основной орган-мишень для действия адипокинов, гормонов жировой ткани. Одним из ключевых адипокинов является лептин – регулятор пищевого поведения (гормон насыщения) и энергетического баланса, в целом (DePaoli A.M., 2014). Многочисленные исследования подтверждают его профиброгенное действие на печень (Marra F. et al., 2011; Buechler C. et al., 2017). В частности, *лептин обладает способностью активировать различные типы клеток, участвующие в процессе повреждения печени (КК, СЭК и ЗКП), а также усиливать фагоцитарную активность и выработку цитокинов КК и макрофагами (Diehl A.M., 2002), стимулировать пролиферацию эндотелиоцитов и продукцию ими АФК (Rahtouni K., 2005; Buechler C. et al., 2017).*

Проведенный нами анализ содержания лептина в плазме крови у больных АФП позволил выявить значимое его повышение (относительно контроля и группы сравнения) уже на начальных стадиях фиброза; адипокин достигал своего максимума в терминальной стадии процесса (таблица 7). Результаты

регрессионного анализа позволили продемонстрировать зависимость уровня лептина со стадией фиброза (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,638$; $p < 0,05$).

В литературе существуют весьма противоречивые сведения относительно содержания лептина у больных АБП. Так, одни авторы констатируют, что поскольку действие этанола способствует потере массы тела, то, как следствие, продукция лептина ЖТ снижается (Tan X., 2012), что является вполне логичным. Напротив, полученные нами результаты, в целом, согласуются с данными коллектива Kasztelan-Szczerbinska В. и др. (2013). В частности, они могут быть объяснены тем фактом, что лептин, помимо ЖТ, синтезируется также активированными ЗКП, аутокринно стимулируя собственную продукцию (Ikejima K. et al., 2002).

Активация лептином сигнального JAK/STAT пути играет решающую роль в секреции продуктов внеклеточного матрикса активированными ЗКП (Choi S.S. et al., 2010). Подтверждением вышесказанного являются выявленные нами у больных АФП *общие* позитивные корреляции уровня лептина с молекулами ВКМ ($r = 0,561$ - с TIMP-1, $r = 0,812$ - с коллагеном IV типа, $r = 0,552$ - с ГК, $p < 0,05$ во всех случаях, соответственно).

Связываясь со своим рецептором на активированных ЗКП, лептин способен повышать экспрессию и продукцию эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), а также усиливать синтез провоспалительных и профиброгенных факторов в этих клетках (Ikejima K. et al., 2001; Aleffi S. et al., 2005). Подтверждением вышесказанного явилось обнаружение позитивной ассоциации между лептином и TGF- β у больных АФП (общая корреляция $r=0,709$, $p < 0,05$), а также с основными провоспалительными медиаторами - TNF α и IL-8 (*общие корреляции* $r=0,689$, $r=0,734$, $p < 0,05$, соответственно), что указывает на его провоспалительные свойства.

Другой адипокин адипонектин, наряду с метаболическими эффектами, оказывает протекторное действие при различных заболеваниях печени (Udomsinprasert W. et al., 2018), подавляя развитие и прогрессирование фиброза этого органа (Kamada Y. et al., 2003).

У обследованных нами больных АФП, независимо от стадии фиброза, регистрировалось достоверное снижение плазменного содержания адипонектина (таблица 7). Результаты регрессионного анализа позволили констатировать отрицательную зависимость плазменного содержания адипонектина со стадией фибротического процесса ($r^2 = -0,781$, $p < 0,05$). Уменьшение экспрессии и секреции адипонектина *in vitro* и *in vivo* установлено в моделях хронического воздействия алкоголя у животных (Gamberi T., 2018). Кроме того, хроническое потребление этанола у мышей приводит к специфическому снижению экспрессии *AdipoR2* в печени (Ajmo J.M., 2008), однако точный механизм до конца неизвестен.

Согласно данным литературы, адипонектин подавляет пролиферацию, миграцию и активацию ЗКП (Ramezani-Moghadam M. et al., 2015), а также снижает отложение ВКМ, посредством изменения соотношения MMP-1 к TIMP-1 (Handy J.A., 2010). Ингибирование TIMP-1 является потенциальным механизмом, лежащим в основе антифиброзных эффектов адипонектина (Handy J.A., 2010). Интересным, на наш взгляд, явилось обнаружение только у лиц группы сравнения отрицательной зависимости между уровнем адипонектина и TIMP-1 ($r = -0,871$, $p < 0,05$).

Показана взаимная регуляция экспрессии адипонектина и TGF- β 1 (Park P.H. et al., 2006; Tomita K. et al., 2008). В проведенном нами исследовании у всех больных АФП были обнаружены обратно пропорциональные зависимости между содержанием адипонектина и TGF- β 1 ($r = -0,656$, $p < 0,05$), что может свидетельствовать об TGF- β 1-опосредованном угнетении секреции адипонектина. Тогда как обнаруженная нами отрицательная корреляция между исследуемыми параметрами у лиц группы сравнения, напротив, свидетельствует о протекторном влиянии адипонектина ($r = -0,760$, $p < 0,05$).

В дополнение к метаболическим и антифиброзным эффектам, адипонектин обладает противовоспалительными свойствами (Kern P.A. et al., 2003), что подтверждается выявленными нами негативными ассоциациями адипонектина с TNF- α у лиц группы сравнения и пациентов с I ст. фиброза ($r = -0,671$, $r = -0,561$, $p < 0,05$), а также позитивными с IL-10 ($r = 0,690$, $p < 0,05$ – группа сравнения). Напротив, регистрируемые на более продвинутых (III и IV) стадиях фиброза

отрицательные корреляции ($r = -0,521$, $r = -0,667$, $p < 0,05$) между исследуемыми показателями, могут свидетельствовать об угнетении продукции адипокина TNF- α .

Факт отрицательной регуляции адипонектина и TNF- α установлен в жировой ткани, а также в других органах (An L. et al., 2012). Выявлено, что снижение экспрессии исследуемого медиатора адипоцитами осуществляется через подавление транскрипционной активности PPAR- γ и белка, связывающего ССААТ / энхансер (С / EBP), а также при активации с-Jun N-терминальной киназы (JNK) (Kim K.Y. et al., 2005).

Как уже упоминалось ранее, адипонектин экспрессируется покоящимися ЗКП, тогда как лептин - активированными (Shafiei M.S. et al., 2011). Мы предполагаем, что реципрокные отношения между адипонектином и лептином, в норме, способствуют гомеостатическому поддержанию метаболических эффектов в печени. Тогда как выявленные нами негативные взаимосвязи ($r = -0,635$, $p < 0,05$) между уровнем лептина и адипонектина у больных на терминальных стадиях АФП, напротив, свидетельствуют о развитии дисбаланса ключевых адипокинов, в сторону преобладания медиатора с профиброгенным действием.

Употребление этанола, даже умеренное, изменяет врожденные и адаптивные иммунные реакции, выявляя специфические нарушения в зависимости от длительности и интенсивности его приема (острое, хроническое) и наличия/отсутствия АБП (Laso F.J. et al., 2010). Как уже упоминалось ранее, провоспалительные реакции, развивающиеся вследствие длительного приема алкоголя, играют важную роль в патогенезе АБП (Газатова Н.Д. и др., 2018; Szabo G., Csak T., 2012). 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.) (Molina P.E. et al., 2010; Pasala S. et al., 2015).

У обследованных нами больных АФП, злоупотребляющих алкоголем, значимое снижение числа лимфоцитов, содержания CD45⁺CD3⁺ и CD45⁺CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови регистрировалось только на III и IV

стадиях фиброза в сравнении с контролем и группой хронических алкоголиков без АБП (таблица 8). У больных АФП с I-II ст., напротив, наблюдалось незначительное увеличение исследуемых параметров (таблица 8). Установленная нами *общая* негативная корреляция ($r = -0,783$, $p < 0,05$) между относительным содержанием лимфоцитов и стадией фиброза у больных АПФ находит отражение в зарубежных исследованиях (Matos L.C. et al., 2013). Более ранние работы L. Lombardo и др. свидетельствуют о взаимосвязи между уменьшением числа $CD3^+CD4^+$ и тяжестью течения цирроза печени (Lombardo L. et al., 1995).

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 (Pasala S. et al., 2015). Группой авторов обнаружено, что у лиц, злоупотребляющих алкоголем без заболевания печени (Naude C.E. et al., 2011) и у пациентов с алкогольным циррозом (Laso F.J. et al., 1996) значительная лимфопения опосредована равномерным уменьшением числа $CD4$ и $CD8$ популяций Т-лимфоцитов в циркуляции. Другие исследования, напротив, демонстрируют (Cook R.T. et al., 1991) рост числа $CD3$ Т-клеток у хронических алкоголиков без АБП, в основном, за счет увеличения числа активированных цитотоксических лимфоцитов (Arosa F.A. et al., 2000).

$CD3^+CD8^+$ лимфоциты являются уникальной субпопуляцией (Zaldivar Fujigaki J.L. et al., 2015), обладающей способностью модулировать свое окружение через секрецию различных медиаторов и прямую цитотоксичность (Kaech S.M., Cui W., 2012). Ранее было высказано предположение об участии $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов в повреждении печени (Jerrells T.R., 2002). У обследованных нами пациентов с АФП на начальных и умеренных (I-II) стадиях фиброза, содержание (относительное) $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов было значительно выше соответствующих показателей здоровых доноров и лиц, не имеющих структурных и функциональных нарушений печени (таблица 8), тогда как на более продвинутых стадиях

заболевания регистрировалось значительное снижение абсолютного и относительного их содержания (таблица 8).

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 NKT - клеток (Arosa F.A. et al., 2000; Laso F.J. et al., 2010), что предполагает потенциальную роль эффекторных цитотоксических клеток в формировании фиброза печени через механизмы иммуноопосредованного апоптоза гепатоцитов (Batey R.G., 2002; Laso F.J. et al., 2010). $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоциты, перенесенные от мышей с экспериментальным циррозом животным с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, индуцировали у последних фиброз печени (Safadi R. et al., 2004).

В тоже время, согласно данным литературы, на более продвинутых стадиях фиброза у пациентов с циррозом печени и активным потреблением этанола число цитотоксических $CD4/CD8$ и NKT 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 1 (Laso F.J. et al., 2010). Выявленная нами негативная корреляция между содержанием $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов и TGF- β 1 ($r = -0,673$, $p < 0,05$) у больных АФП с IV ст. фиброза подтверждают данные литературы.

В зарубежной литературе также представлены данные, что снижение числа цитотоксических Т-клеток в циркуляции на терминальных стадиях фиброза (цирроза) может быть опосредовано повышенной гибелью $CD8^+$ Т-клеток, индуцированной этанолом через митохондриальный путь апоптоза (Szuster-Ciesielska A. et al., 2005), а также возможным фагоцитозом $CD8^+$ лимфоцитов активированными ЗКП (Muhanna N. et al., 2008). Наряду с вышеприведёнными сведениями, продемонстрирован факт усиленной миграции цитотоксических лимфоцитов в печень, что подтверждается присутствием активированных $CD4$ и $CD8$ Т-лимфоцитов в воспалительных печеночных инфильтратах при тяжелом фиброзе/циррозе алкогольной этиологии (Ramaiah S. et al., 2004; Celli R., Zhang X., 2014). Так, экспериментально было показано, что этанол дозозависимым образом

индуцирует на CD4 и CD8 Т-лимфоцитах экспрессию хемокиновых рецепторов - CXCR3 и CXCR4, а также молекул адгезии на эндотелии сосудов - VCAM-1 и ICAM-1, обеспечивая миграцию этих клеток в печень (Karim S. et al., 2013).

В то же время выявленные нами у больных АФП с циррозом печени позитивные корреляции содержания CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов с молекулами ВКМ – в частности, с коллагеном IV типа (общая корреляция $r=0,811$, $p<0,05$), а также с провоспалительным медиатором TNF α (общая корреляция $r=0,620$, $p<0,05$) подтверждают данные литературы, свидетельствующие о потенцирующем влиянии CD8 Т-лимфоцитов на фиброгенную активность ЗКП (Safadi R. et al., 2004).

Следует отметить, что в условиях физиологической нормы высокое содержание активированных CD8 Т-клеток и Т-лимфоцитов памяти в печени связывают с механизмами утилизации этих клеток, вследствие апоптотической гибели, индуцированной активацией антигеном (Robinson M.W. et al., 2016).

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 (таблица 8). Впервые лимфопения и увеличение ИР (CD4/CD8) у больных алкогольным циррозом с прогрессирующей печеночной недостаточностью были описаны Couzigou и др. (Couzigou P. et al., 1984), что было подтверждено и более поздними работами (Muhanna N. et al., 2008; Matos L.C. et al., 2013). Интересно отметить противоположную зависимость у больных вирусными гепатитами (отрицательные корреляции между значениями ИР и стадией фиброза печени) (Muhanna N. et al., 2008).

Особый интерес в нашем исследовании представляла оценка числа Т-клеток, несущих маркеры наивных Т-клеток (T_N, CD3⁺CD62L⁺CD45RA⁺), Т-лимфоцитов центральной (T_{CM}, CD3⁺CD62L⁺CD45R0⁺) и эффекторной (T_{EM}, CD3⁺CD62L⁻CD45R0⁺) иммунной памяти, а также терминально-дифференцированных эффекторов, реэкспрессирующих высокомолекулярную изоформу рецептора CD45 – CD45RA (T_{EMRA}, CD3⁺CD62L⁻CD45R0⁻). Последние отличаются низкой теломеразной активностью, способностью продуцировать провоспалительные молекулы (в частности, TNF α), ростом экспрессии поверхностного маркера CD57, а

также высоким внутриклеточным содержанием перфорины и гранзима А (Кудрявцев И.В., 2014; Тодосенко Н.М., 2018; Matsuki F. et al., 2014).

Известно, что гетерогенные по фенотипическим, анатомическим и функциональным характеристикам субпопуляции Т-клеток памяти характеризуются антиген-независимой персистенцией, самообновлением и способностью к самоподдержанию (Chang J.T., 2014; Bhargava P., 2015), обеспечивая быстрый и эффективный ответ при повторном воздействии патогенов инфекционной и неинфекционной природы (Farber D.L. et al., 2014). 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 (Zhang H., Meadows G.G., 2005), 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 на разных стадиях развития патологического процесса, 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 (таблица 13). 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 Т-лимфоцитов было значительно ниже нормы ($\approx 15\%$) (таблица 13).

В современной литературе приведены сведения, касающиеся влияния этанола на изменение фенотипа наивных Т-лимфоцитов. В целом, при злоупотреблении алкоголем регистрируется снижение числа наивных (CD45RA) клеток на фоне увеличения (CD45R0) Т-клеток памяти (Газатова Н.Д. и др., 2018; Zhang H., Meadows G.G., 2005 ; Barr T., 2016). Обнаруженное нами снижение относительного числа T_N и T_{CM} лимфоцитов в крови больных АФП с терминальными стадиями заболевания (таблица 13) ассоциировалось с ростом

количества эффекторных клеток - T_{EM} и T_{EMRA} , что позволяет нам предположить у этой категории больных факт прямой дифференцировки наивных Т-клеток и Т-лимфоцитов центральной памяти в эффекторные. Наше предположение подтверждается сильными корреляциями отрицательного характера между содержанием T_N с T_{EMRA} ($r=-0,463$, $r=-0,673$ – для больных АПФ с III и IV ст. фиброза; $p < 0,05$) и T_{EM} ($r=-0,661$, для больных АПФ с IV ст. фиброза; $p < 0,05$); T_{CM} с T_{EMRA} ($r=-0,631$, для больных АПФ с IV ст. фиброза; $p < 0,05$) и T_{EM} ($CD3^+CD62L^-CD45RO^+$) ($r=-0,891$, для больных АПФ с IV ст. фиброза; $p < 0,05$). Результаты проведенного нами регрессионного анализа позволили продемонстрировать положительную зависимость содержания T_{EMRA} у больных АФП со стадией фиброза (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,831$; $p < 0,05$) и отрицательную с числом наивных Т-клеток (коэффициент регрессии: $r^2 = -0,761$; $p < 0,05$). У лиц, злоупотребляющих алкоголем без АБП также были обнаружены негативные ассоциации между числом T_N с T_{EM} ($r=-0,522$, $p < 0,05$) и T_{CM} с T_{EM} ($r=-0,391$; $p < 0,05$).

Обнаруженные нами у больных АФП взаимосвязи между относительным содержанием T_{EMRA} и T_{EM} лимфоцитов в крови с провоспалительными факторами, в частности с $TNF\alpha$ и IL-8 (общая корреляция T_{EMRA} , T_{EM} с $TNF\alpha$ $r=0,672$ и $r=0,553$; T_{EMRA} и IL-8 $r=0,811$ – у больных АФП с IV ст.; T_{EM} с $TNF\alpha$ и IL-8 $r=0,563$ и $r=0,667$ – у больных АФП с IV ст. фиброза, $p < 0,05$ во всех случаях соответственно), а также общие корреляции T_{EMRA} и T_{EM} лимфоцитов с сывороточной концентрацией молекул ВКМ (общие корреляции T_{EMRA} с ГК и *коллагеном IV типа* $r=0,748$ и $r=0,621$; T_{EM} с *коллагеном IV типа* и *TIMP-1* $r=0,761$ и $r=0,522$, $p < 0,05$ во всех случаях соответственно), свидетельствуют о провоспалительном и профиброгенном потенциале эффекторных клеток памяти. Кроме того, выявленная нами взаимосвязь между числом T_{EMRA} клеток и содержанием $CD8^+$ Т-лимфоцитов у больных АФП с IV ст. фиброза ($r=0,629$, $p < 0,05$) доказывает участие цитотоксических лимфоцитов в патогенезе АБП.

Таким образом, у лиц с хроническим активным злоупотреблением алкоголя на терминальных стадиях АФП, снижение числа наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток центральной памяти сопровождается образованием Т-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 тоже время уменьшение пула наивных Т-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 (IFN) и натуральными киллерами (NK, natural killer) (Szabo G., Csak T., 2012; Peng H. et al., 2016). В литературе описаны антифибротические эффекты NK-клеток *in vivo* и *in vitro*, запуск которых происходит при повреждении печени (Muhanna N. et al., 2008). С одной стороны, следует отметить протекторную роль NK-клеток в патогенезе фиброза, вирусных гепатитов и опухолевых заболеваний печени, с другой, участие некоторых субпопуляций этих клеток (в частности, iNKT-клетки, несущие инвариантный Т-клеточный рецептор) в механизмах повреждения и воспалении печени не вызывает сомнения (Szabo G., Csak T., 2012; Peng H. et al., 2016).

У пациентов с I - II ст. АФП относительное содержание NK-клеток ($CD3^+CD16^+CD56^+$) в периферической крови достоверно ($p < 0,05$) 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 ($p < 0,05$) (таблица 10). В литературе существуют весьма разнонаправленные данные по влиянию этанола на NK-клетки. Некоторые авторы в эксперименте обнаружили способность алкоголя ингибировать цитолитическую функцию NK-клеток (Zhou J., Meadows G.G., 2003), тогда как другими группами были получены противоположные результаты (Laso F.J. et al., 1997, Laso F.J. et al., 2010). Установлен интересный факт: снижение цитолитической активности натуральных киллеров при длительном воздействии этанола без патологии печени регистрируется на фоне повышения общей цитотоксичности, опосредованной другими клетками (Waldschmidt T.J., 2008; Laso F.J. et al., 2010). В тоже время выявлено, что подавление функций NK-клеток печени при хроническом употреблении алкоголя

способствует патогенезу АБП (Jeong W.I. et al., 2008). Уменьшение активности НК-клеток и их числа на периферии при АБП может быть связано с избирательным хоумингом этих клеток в очаг воспаления, в сочетании с этанолиндуцированным нарушением их продукции в костном мозге (Langhans B. et al., 2015; Zhang X. et al., 2017).

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 (Spengler U. et al., 2013; Langhans B. et al., 2015; Peng H. et al., 2016; Byun J.S. et al., 2017), где наиболее важным является активация НК-клеток интерферонами- α , - β и - γ (Jeong W.I., Gao B., 2008). Учитывая, что ≈ 30 -50% лимфоцитов печени - НК-клетки, факт регуляции последними активности ЗКП представляется вполне логичным (Laso F.J. et al., 1997; Byun J.S., Jeong W.I., 2010). Введение этанола в эксперименте значительно увеличивает резистентность ЗКП к апоптозу, через угнетение активности НК-клеток и их способности продуцировать IFN γ (Jeong W.I. et al., 2008). Было также показано, что хроническое потребление этанола ингибирует гибель активированных ЗКП, опосредованную НК-клетками, за счет подавления в них экспрессии рецептора NKG2D, цитокина TRAIL, гранзимов, перфорина и IFN- γ (Pan H.N. et al., 2006). Кроме того, прием этанола стимулирует продукцию ЗКП TGF- β , который ингибирует функции НК-клеток (Jeong W.I. et al., 2008). Последний тезис подтвержден выявленными нами негативными корреляциями между содержанием CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клеток и уровнем TGF- β ($r = -0,452$, $r = -0,591$, $p < 0,05$ у больных АФП с III и IV стадиями фиброза) и IL-10 ($r = -0,433$, $p < 0,05$ - при IV стадии фиброза). 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 стадиях заболевания, индуцированного длительным приемом алкоголя.

Для понимания иммунопатогенеза АБП, особый интерес представляло исследование в крови больных АФП содержания CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-

лимфоцитов, так называемых Т-регуляторных клеток (Treg). Последние играют важную роль в поддержании гомеостаза, препятствуя развитию чрезмерных иммунных реакций, в том числе, аутоиммунных (Vonghia L. et al., 2015).

У обследованных нами пациентов повышение относительного и абсолютного содержания Treg лимфоцитов (относительно контроля и группы сравнения) в образцах периферической крови регистрировалось только у пациентов с продвинутыми стадиями фиброза ($p < 0,05$) (таблица 9).

Согласно данным литературы, Treg лимфоциты участвуют в патогенезе фиброза печени, преимущественно, за счет прямого (контактного) подавления активности макрофагов с фенотипом M1, КК, НК, и, в меньшей степени, CD8⁺ Т-клеток, а также опосредованно, за счет продукции противовоспалительных (TGF- β 1, IL-10) факторов (Zhang X. et al., 2017). Чрезмерная регуляция иммунных реакций этими клетками способствует формированию хронического воспаления и фиброза печени (Świdarska M. et al., 2017).

У обследуемых нами больных АФП нами обнаружена общая корреляция между числом Treg лимфоцитов и IL-10 ($r=0,788$, $p < 0,05$), а у больных АФП с более продвинутыми стадиями (III и IV) с TGF- β 1 ($r= 0,541$, $r= 0,671$, $p < 0,05$).

В некоторых работах сообщается о высоком содержании CD4⁺ Treg лимфоцитов в периферической крови пациентов с циррозом печени, что позволяет предположить, что они могут быть вовлечены в патогенез этого заболевания. В частности показано, что Treg участвуют в поддержании фиброза печени посредством регуляции баланса MMP / TIMP-1 (Zhang X. et al., 2017). Выявленные нами положительные корреляции между содержанием Treg лимфоцитов и TIMP-1 ($r=0,792$, $p < 0,001$) у больных АФП с циррозом вполне согласуются с данными литературы.

Кроме того, обнаружено, что Treg лимфоциты в кооперации с КК, создают локальную супрессивную микросреду, ограничивая реакции цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток (Zhang X. et al., 2017; Jeffery H.C. et al., 2016).

Кроме того, вполне логичным является предположение, что прогрессии фиброза печени, индуцированного приемом алкоголя, может способствовать дисрегуляция кооперативных взаимодействий между клетками врожденного и

адаптивного иммунитета. В частности, при хроническом гепатите С установлено угнетающее влияние $CD4^+$ Treg лимфоцитов на эффекторные функции НК-клеток печени, что способствует снижению цитотоксичности последних в отношении активированных ЗКП (Langhans B. et al., 2015). Выявленные нами негативные взаимосвязи между относительным содержанием $CD3^-CD16^+CD56^+$ и $CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ клеток в периферической крови у больных с III и IV ст. фиброза ($r = -0,763$, $r = -0,901$, $p < 0,001$), а также описанные ранее между числом $CD3^-CD16^+CD56^+$ клеток и уровнем TGF- β у больных АФП с III и IV стадиями фиброза ($r = -0,452$, $r = -0,591$, $p < 0,05$) и IL-10 ($r = -0,433$, $p < 0,05$) у больных АФП с IV стадией фиброза, в целом, подтверждают угнетающее влияние Т-регуляторных клеток в отношении популяции естественных киллеров, что может способствовать снижению антифибротических эффектов последних с утратой контроля над процессами фиброгенеза на терминальных стадиях заболевания, индуцированного хроническим 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. (Nutt S.L. et al., 2015; Byun J.S., Yi H.S., 2017; Zeiser R. et al., 2018).

У обследованных нами лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, на начальных и умеренных стадиях фиброза печени, содержание (*относительное и абсолютное*) В-клеток ($CD3^-CD19^+$) 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 (таблица 11).

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 (Laso F.J. et al., 1996; Laso F.J. et al., 2010; Matos L.C. et al., 2013). Аналогичные изменения выявлены также у хронических алкоголиков без патологии печени (Laso F.J. et al., 1996), 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 (Wang H. et al., 2011). 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 (EBF и Pax5) (Wang H. et al., 2011).

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.). (Novobrantseva T.I. et al., 2005). Императивная роль В-клеток выявлена также в патогенезе аутоиммунного диабета у NOD- мышей (Serreze D.V. et al., 1996) и волчаночного нефрита в полигенных, fas-интактных и fas-дефицитных моделях системного аутоиммунитета у MRL-мышей (Chan O.T. et al., 1999). В обоих случаях антителонезависимый механизм вовлечения В-клеток в патогенез этих заболеваний оказался превалирующим (Novobrantseva T.I. et al., 2005).

В литературе также встречаются отдельные работы, свидетельствующие, что в контексте общей В-лимфопении при хроническом алкоголизме повышается относительное содержание В-клеток, продуцирующих неспецифические IgM и IgA, на фоне снижения секреции IgG, что предполагает потенциальную роль этих изменений в формировании аутоиммунных и иммунодефицитных состояний при АБП (Laso F.J. et al., 2010; Matos L.C. et al., 2013). Развитие получила также гипотеза о вовлечении TLR-сигналинга в формирование гипериммуноглобулинемии у пациентов с АБП (Massonnet V. et al., 2009).

Таким образом, снижение числа В-клеток в периферической крови мы констатировали только на терминальных стадиях фиброза, тогда как у пациентов, злоупотребляющих алкоголем, на начальных стадиях 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/эндотоксины, образующиеся вследствие токсического действия метаболитов этанола и повышенной проницаемости кишечной стенки у данной категории лиц.

Как уже упоминалось ранее, индуцированная алкоголем активация клеток врождённого иммунитета в крови (моноциты) и печени (КК) является ключевым фактором развития АБП (Nagy L.E., 2015).

Согласно полученным нами результатам, абсолютное содержание моноцитов в периферической крови у больных АФП коррелировало со стадией фиброза печени (общая корреляция $r=0,871$, $p < 0,05$) (таблица 14).

Относительно недавно было установлено, что миграция моноцитов крови в печень с последующей их инфильтрацией, в дополнение к активации классических КК, является существенной в патогенезе фиброгенеза при действии гепатотоксических агентов (Bataller R., Brenner D.A., 2005; Karlmark K. R. et al., 2009; Laso F.J. et al., 2010; Taske F., 2017). Выявленная общая корреляция между содержанием моноцитов и IL-8 ($r=0,776$, $p < 0,05$), основным фактором хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов, у больных АФП с терминальными стадиями фиброза подтверждает вышесказанное.

Кроме того, обнаруженные нами позитивные взаимосвязи между относительным содержанием $CD45^+CD3^-CD14^+$ клеток в крови и сывороточным уровнем TNF- α у больных АФП на продвинутых стадиях фиброза ($r=0,635$, $r=0,811$, $p < 0,05$), а также с концентрацией IL-8 у больных АФП с III и IV ст. (общая корреляция $r=0,776$, $p < 0,05$) могут свидетельствовать о вкладе моноцитов периферической крови в формирование провоспалительного фона в контексте хронического приема алкоголя и быть фактором, способствующим развитию процессов фиброгенеза. Последний тезис подтверждается также обнаруженными нами у больных АФП корреляциями между содержанием моноцитов с молекулами ВКМ (общие корреляции - $r=0,451$ с коллагеном IV типа, $r=0,870$ с ГК, $p < 0,05$).

Известно, что следствием гипоксии при хроническом воздействии этанола является развитие окислительного стресса в органах и тканях, в том числе в паренхиме печени, что приводит к морфофункциональным нарушениям органа

(Thakur V. et al., 2006). По некоторым данным, АФК, синтезируемые фагоцитирующими клетками, в частности, нейтрофилами и моноцитами, индуцируют процессы перекисного окисления липидов и образование аддуктов белка в тканях печени, что впоследствии инициирует синтез коллагена (Guyot C. et al., 2006), и, как следствие, процессы фиброзирования поврежденных тканей (Nieto N. et al., 2002). В связи с вышесказанным, выявленное нами повышение (относительно контроля и группы сравнения) показателей в тесте восстановления нитросинего тетразолия, отражающего активацию гексозомонофосфатного шунта и степень функционального раздражения моноцитов *in vivo* у пациентов с АФП (независимо от стадии фиброза печени) (за исключением индекса стимуляции) (таблица 15), может свидетельствовать о значительном напряжении механизмов кислородзависимой биоцидной активности моноцитов при АФП, обеспечивая реализацию их цитотоксического действия не только в отношении антигенных структур, но и клеток макроорганизма.

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 является адаптивной реакцией организма, развивающейся в ответ на повреждение органов и тканей (Anderson D.J. et al., 2001). 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. Определена способность циркулирующих стволовых клеток с фенотипом CD34⁺CD45⁻ дифференцироваться в эпителиальные клетки кожи и клетки желудочно-кишечного тракта и гепатоциты (Körbling M. et al., 2002). Этими же авторами было высказано предположение о переключении направления дифференцировки стволовых гемопоэтических клеток под воздействием сигналов местного микроокружения. Широко обсуждается вопрос о способе дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток в гепатоциты, в частности, за счет механизмов слияния и трансдифференцировки (Jang Y.Y. et al., 2004; Lizier M. et al., 2018).

Согласно полученным нами результатам, содержание CD45⁺CD34⁺/CD133⁺ клеток в образцах периферической крови пациентов с АФП на начальных и умеренных стадиях фиброза, значительно превышало контрольные цифры, в среднем в 2,5 раза ($p < 0,05$), а также показатели группы сравнения (\approx в 1,4 раза). У больных хроническим алкоголизмом с АФП на терминальных стадиях фиброза число CD34 и CD133 позитивных клеток в образцах периферической крови значительно снижалось относительно результатов контроля и группы сравнения (таблица 12).

Полученные нами результаты у больных АФП на начальных и умеренных стадиях фиброза частично согласуются с данными зарубежной литературы. Установлено, что при хронических заболеваниях печени, ассоциированных со снижением регенеративной способности гепатоцитов, регистрируется мобилизация стволовые гемопоэтические клетки из костного мозга и повышение их уровня в циркуляции и печени, опосредованные активацией миграционной оси SDF-1/CXCR4 (Wynn T.A., 2007; Herencia C. et al., 2011; Abdellatif H., 2018). 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-1 α , TNF α и IL-6) из поврежденных клеток, могут рекрутировать реактогенные циркулирующие клетки крови в печень (Wynn T.A., 2007). Выявленные нами у больных АФП с начальными и умеренными (I и II) ст. фиброза положительные корреляции между содержанием CD45⁺CD34⁺ клеток и уровнем IL-6 ($r=0,673$, $p<0,05$), числом CD45⁺CD133⁺ клеток и IL-6 ($r=0,491$, $p<0,05$) и IL-8 ($r=0,501$, $p<0,05$) позволяют предположить, что повышенные уровни CD34 и CD133 клеток в периферической крови пациентов, злоупотребляющих алкоголем, на начальных стадиях фиброза, связаны с персистирующим воспалением в паренхиме печени и дисбалансом между процессами ее повреждения, и эндогенными репаративными возможностями (Abdellatif H., 2018). 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 CD34 клеток, обнаруживаемых в печени, являются гемопоэтическими и принимают участие в ее регенерации (Бурганова Г.Р. и др., 2012). В настоящее время инфузия CD34 и CD133 клеток в воротную вену (Salama H. et al., 2010) и чревный ствол (Бурганова Г.Р. и др., 2012), печеночную артерию (Lyga A.C., 2010) пациентам с терминальной стадией цирроза печени может улучшить их клиническое состояние. Аналогичные исследования также показали, что стволовые гемопоэтические клетки способствуют регенерации и восстановлению функции печени в результате травмы (Levicar et al., 2008; Garg V. et al., 2012; Lv B. et al., 2014; Kwak K.A. et al., 2018).

У обследуемых нами больных АФП с терминальными (III и IV) стадиями фиброза были обнаружены, напротив, негативные взаимосвязи числа CD34 и CD133 клеток с уровнем TNF- α (общие корреляции $r = -0,821$, $r = -0,672$, $p < 0,05$) и количества CD133 клеток с IL-8 и TGF- $\beta 1$ (общие корреляции $r = -0,665$, $r = -0,781$, $p < 0,05$). На наш взгляд, снижение количества гемопоэтических клеток (CD34 и CD133) клеток 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, опосредованного в том числе, дисбалансом факторов с про- и антифиброзным действием. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фиброз печени, индуцированный действием большинства гепатотоксических факторов, в т.ч. этанолом, закономерно характеризуется цикличностью процессов повреждения/восстановления печеночной паренхимы. На наш взгляд, полученные результаты, направленные на выявление связи морфофункциональных индексов крови с изменениями в печени, формирующимися на разных стадиях этанол-

индуцированного фиброза, являются актуальными и своевременными и нуждаются в дальнейшем изучении.

Наше исследование позволило выявить, что при фиброзе печени, формирующимся при злоупотреблении алкоголем, значимый дисбаланс медиаторов с про- (IL-6, IL-8, TNF α , TGF- β 1, IL-10 и лептин) и антифиброгенным (адипонектин) действием, в целом, определяет прогрессию заболевания. В тоже время установлено, что у больных алкогольным фиброзом печени рост концентрации молекул внеклеточного матрикса (TIMP-1, коллагена IV типа, ГК), а также повышение активности ферментов печени в сыворотке крови, ассоциированные со стадией фиброза, опосредованы, с одной стороны увеличением содержания эффекторных популяций Т-клеток памяти, моноцитов с высокой биоцидной активностью, а также регуляторных Т-клеток с супрессивным потенциалом, с другой, увеличением уровня факторов с профиброгенным действием (IL-6, IL-8, TNF α , TGF- β 1 и IL-10) в крови. Кроме того обнаружено, что значительная лимфопения на терминальных стадиях фиброза с изменением состава основных субпопуляций лимфоцитов и снижением числа гемопозитических клеток (относительно контроля и группы сравнения) в крови у больных алкогольным фиброзом печени сопровождается ростом количества эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM} и T_{EMRA}), на фоне снижения содержания наивных (T_N) и Т-лимфоцитов центральной памяти (T_{CM}), что может усугублять течение тканедеструктивного процесса за счет высокой биоцидной активности эффекторных клеток.

Выявленные нами взаимосвязи клеточных и гуморальных показателей крови с патологическими изменениями, в зависимости от стадии фиброза печени алкогольного генеза, отражены в заключительной схеме (рисунок б).

В целом, выяснение особенностей морфофункциональных характеристик крови, а также механизмов межклеточной кооперации клеток врожденного и адаптивного иммунитета с гепатоцитами, значительно расширит представления о фундаментальных механизмах, опосредующих патологическое ремоделирование печени, индуцированное гепатотоксическими факторами.

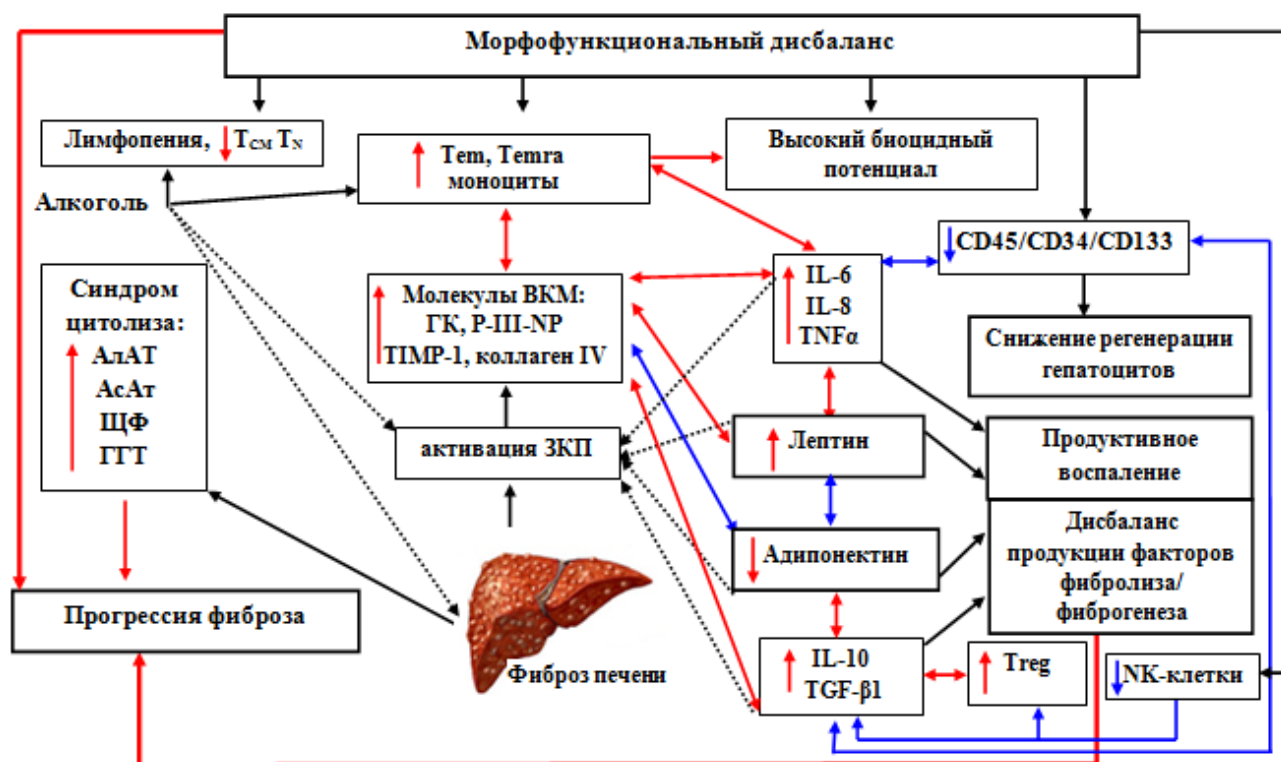


Рисунок 6. Взаимосвязи клеточных и гуморальных показателей крови с патологическими изменениями в печени, формирующимися при этанол-индуцированном фиброзе (по результатам собственных исследований и данным литературы).

Обозначения. $\uparrow \downarrow$ позитивные/негативные корреляции; \uparrow зависимость от стадии фиброза
 $\uparrow \downarrow$ повышение/снижение показателя; \ddagger по данным литературы

ВЫВОДЫ

1. Повышение в сыворотке крови у больных алкогольным фиброзом печени активности печеночных ферментов (АсАТ, ГГТ), значений коэффициента де Ритиса, концентрации молекул внеклеточного матрикса (TIMP-1, коллагена IV типа и ГК) ассоциировано со стадией прогрессии патологического процесса.
2. В сыворотке крови больных алкогольным фиброзом печени установлено повышение уровня провоспалительных (IL-6, IL-8 и TNF α) и противовоспалительных (IL-10 и TGF- β 1) факторов.
3. У больных алкогольным фиброзом печени увеличение концентрации адипокина лептина и снижение уровня адипонектина в крови коррелирует со стадией заболевания.
4. При алкогольном фиброзе печени в крови регистрируется снижение числа наивных Т-клеток (T_N), ассоциированное со стадией развития патологического процесса и содержания Т-лимфоцитов центральной памяти (T_{CM}).
5. У больных алкогольным фиброзом печени повышение числа эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM} и T_{EMRA}) и моноцитов в крови ассоциировано со стадией заболевания; положительные корреляции количества этих клеток с концентрацией молекул внеклеточного матрикса и уровнем провоспалительных факторов в крови, свидетельствуют об их связи с процессами фиброгенеза.
6. Негативные корреляции между уровнем Т-регуляторных клеток и продуцируемых ими факторов с супрессорным действием (IL-10 и TGF- β 1) с содержанием естественных киллеров (NK-клетки) в крови, выявленные у больных алкогольным фиброзом печени, свидетельствуют о снижении антифибротических эффектов NK-клеток.
7. Повышение количества гемопоэтических стволовых клеток (CD45⁺/CD34⁺CD133⁺) в крови у больных алкогольным фиброзом печени на начальных и умеренных стадиях развития фиброза значительно снижается на поздних этапах заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. CD34, α -SMA и VCL-2 как маркеры эффективности трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток больным алкогольным циррозом печени / Г. Р. Бурганова, С. Р. Абдулхаков, А. А. Гумерова и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2012. – Т (9). – С.16 – 22.
2. Алкоголь и иммунитет / Н.Д. Газатова, К.А. Юрова, Д.В. Гаврилов и др. // Гены и Клетки. – 2018. – Т. 1. – С. 47–55.
3. Бурганова, Г.Р. Роль макрофагов в патоморфогенезе алкогольной болезни печени / Г.Р. Бурганова, Р.В. Деев, А.П. Киясов // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 38–40.
4. Винницкая, Е.В. Алкогольная болезнь печени в практике терапевта./ Е.В. Винницкая, А.В. Киселева // Эффективная фармакотерапия. – 2014. –№ 7. – С. 19–24.
5. Кремер, Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика / Кремер Н.Ш. – М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2004. – 573 с.
6. Кудрявцев, И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки / И.В. Кудрявцев // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. (4). – С. 947–964.
7. Тодосенко Н.М. 2018. Реакции Т—лимфоцитов больных ревматоидным артритом на глюкокортикоиды *in vitro*: диссертация ... кандидата Биологических наук: 14.03.03. Место защиты: ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».
8. Факторы, способствующие развитию неалкогольной жировой болезни печени и инсулинорезистентности при ожирении / М.А. Вульф, Е.В. Кириенкова, Д.А. Скуратовская и др. // Биомедицинская химия. Т. 64, № 5. – С. 444-450.
9. A cohort study of the effect of alcohol consumption and obesity on serum liver enzyme levels. / Z. Shen, Y. Li, C. Yu, et al. // Eur J Gastroenterol Hepatol. – 2010. – Vol. 22. – P.820–5.

10. A Longitudinal Analysis of Circulating Stress-Related Proteins and Chronic Ethanol Self-Administration in Cynomolgus Macaques / C.M. Helms, I. Messaoudi, S. Jeng et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2012. – Vol. 36(6). – P. 995–1003.
11. Abdellatif, H. Circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells paralleled with level of viremia in patients chronically infected with hepatitis B virus. [Electronic resource] / H. Abdellatif // *Regen Med Res.* – 2018. – Mode of access: <https://www.regenmedres-journal.org/articles/rmr/abs/2018/01/rmr170005/rmr170005.html>
12. Activated CD-8 cells and HLA DR expression in alcoholics without overt liver disease. / Cook R., Garvey M., Booth B. et al. // *J. Clin. Immunol.* – 1991. – Vol. 11(5). – P. 246–53.
13. Activation of Hepatic Stellate Cells After Phagocytosis of Lymphocytes: A Novel Pathway of Fibrogenesis / N. Muhanna, S. Doron, O. Wald et al. // *Hepatology (Baltimore, Md.)*. – 2008. – Vol. 48 (3). – P. 963–977.
14. Acute alcohol consumption inhibits accessory cell function of monocytes and dendritic cells. / Szabo G., Catalano D., White B. et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2004. – Vol. 28(5). – P. 824–8.
15. Acute alcohol exposure exerts anti-inflammatory effects by inhibiting IkappaB kinase activity and p65 phosphorylation in human monocytes / P. Mandrekar, V. Jeliaskova, D. Catalano et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178(12). – P. 7686–93.
16. Acute and chronic alcohol exposure impair the phagocytosis of apoptotic cells and enhance the pulmonary inflammatory response / D.M. Boe, T.R. Richens, S.A. Horstmann et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2010. – Vol. 34(10). – P. 1723–32.
17. Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. / Afshar M., Richards S., Mann D. et al. // *Alcohol.* – 2014. – Vol. 49(1) – P. 57–64.
18. Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis [Electronic resource] / V. Arroyo, R. Moreau, P. S. Kamath et al. // *Nat Rev Dis Primers.* – 2016. – Mode of access: <https://www.nature.com/articles/nrdp201641>
19. Adipokines in Liver Cirrhosis / C. Buechler, E.M. Haberl, L. Rein-Fischboeck et al. // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18(7). – P. 1392.

20. Adiponectin activation of AMPK disrupts leptin-mediated hepatic fibrosis via suppressors of cytokine signaling (SOCS-3) / J.A. Handy, N.K. Saxena, P. Fu et al. // *J Cell Biochem.* – 2010. – Vol. 110. – P. 1195–1207.
21. Adiponectin as a novel biomarker for liver fibrosis. / W. Udomsinprasert, S. Honsawek, Y. Poovorawan // *World J Hepatol.* – 2018. – Vol. 10(10). – P. 708-718.
22. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression / P.A. Kern, G.B. Di Gregorio, T. Lu et al. // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52. – P. 1779–1785.
23. Adiponectin reduces hepatic stellate cell migration by promoting tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) secretion / M. Ramezani-Moghadam, J. Wang, V. Ho, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290. – P. 5533–5542.
24. Adiponectin regulation of stellate cell activation via PPAR γ -dependent and -independent mechanisms / M.S. Shafiei, S. Shetty, P.E. Scherer, et al. // *Am J Pathol.* – 2011. – Vol. 178(6). – P. 2690-9.
25. Adiponectin Signaling Pathways in Liver Diseases [Electronic resource] / T. Gamberi, F. Magherini, A. Modesti et al. // *Biomedicines.* – 2018. Mode of access: <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020052>
26. Albert, M.A. Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. / M.A. Albert, R.J. Glynn, P.M. Ridker // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107(3). – P. 443–7.
27. Alcohol abstinence ameliorates the dysregulated immune profiles in patients with alcoholic hepatitis: A prospective observational study / W. Li, T. Amet, Y. Xing, et al. // *Hepatology.* – 2017. – Vol. 66(2). – P. 575-590.
28. Alcohol Affects the Late Differentiation of Progenitor B Cells. / H. Wang, H. Zhou, S. Mahler, et al. // *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire).* – 2011 – Vol. 46 (1) – P. 26-32.
29. Alcohol and immunity / N.D. Gazatova, K.A. Yurova, D.V. Gavrilov // *Genes and Cells.* – 2018. – Vol. 13(1). – P. 47– 55.
30. Alcohol drinking pattern and risk of alcoholic liver cirrhosis: A prospective cohort study / G. Askgaard, M. Gronbaek, M.S. Kjaer, et al. // *J Hepatol.* – 2015. – Vol. 62. – P.1061–7.

31. Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for TNF- α regulation / P. Mandrekar, D. Catalano, V. Jeliaskova et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – Vol. 84(5). – P. 1335.
32. Alcoholic hepatitis / M.R. Lucey, P. Mathurin, T.R. Morgan // *New England Journal of Medicine.* – 2009. – Vol. 360(26). – P. 2758–2769.
33. Alcoholic liver disease: Pathogenesis, management, and novel targets for therapy / E.S. Orman, G. Odena, R. Bataller // *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* – 2013. – Vol. 28 (1). – P. 77–84.
34. Alcoholic Liver Disease: Role of Cytokines / M.G. Neuman, Y. Maor, R.M. Nanau et al. // *Biomolecules.* – 2015. – Vol. 5(3). – P. 2023-2034.
35. Alterations in Activation, Cytotoxic Capacity and Trafficking Profile of Peripheral CD8 T Cells in Young Adult Binge Drinkers [Electronic resource] / J.L. Zaldivar Fujigaki, A.G. Arroyo Valerio, et al. // *PLoS One.* – 2015. – Vol.10(7) – Mode of access: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0132521>
36. An in vitro model of human acute ethanol exposure that incorporates CXCR3– and CXCR4–dependent recruitment of immune cells / S. Karim, E. Liaskou, S. Hadley et al. // *Toxicol Sci.* – 2013. – Vol. 132 (1). – P. 131–41.
37. Anderson, D.J. Can stem cells cross lineage boundaries? / D.J. Anderson, F.H. Gage, I.L. Weissman // *Nat Med.* – 2001. – Vol.7. – P.393—395.
38. Animal Models of Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Clinical Relevance / B. Gao, M.J. Xu, A. Bertola // *Gene Expr.* –2017– Vol. 17(3). – P.173-186.
39. Anti-fibrotic role and mechanism of *Periplaneta americana* extracts in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats / D. Li, W. Li, Y. Chen et al. // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2018. – Vol. 50 (5). – P. 491-498.
40. Appay, V. Naive T cells: the crux of cellular immune aging? / V. Appay, D. Sauce // *Exp. Gerontol.* – 2014. – Vol. 54– P. 90–3.
41. Association between alcohol and cardiovascular disease: Mendelian randomisation analysis based on individual participant data [Electronic resource] / M.V. Holmes, C.E. Dale, L. Zuccolo et al. // *BMJ.* – 2014. – Mode of access: <https://www.bmj.com/content/349/bmj.g4164>

42. Association between in vivo alcohol metabolism and genetic variation in pathways that metabolize the carbon skeleton of ethanol and NADH reoxidation in the alcohol challenge twin study / P.A. Lind, S. Macgregor, A.C. Heath et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2012. – Vol. 36(12). – P. 2074–85.
43. Association of platelet-derived microvesicles and their phenotypes with carotid atherosclerosis and recurrent vascular events in patients after ischemic stroke / J. Rosińska, W. Ambrosius, J. Maciejewska et al. // *Thromb Res.* – 2019. – Vol. 176. – P. 18-26.
44. Association of serum adiponectin, leptin, and resistin concentrations with the severity of liver dysfunction and the disease complications in alcoholic liver disease [Electronic resource] / B. Kasztelan-Szczerbinska, A. Surdacka, M. Slomka, et al. // *Mediators of inflammation.* – 2013. – Mode of access: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/148526/>
45. Atif, M. Linking the gut and liver: crosstalk between regulatory T cells and mucosa-associated invariant T cells / M. Atif, S. Warner, Ye. H. // *Hepatol Int.* – 2018. – Vol. 12(4). – P. 305-314.
46. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells / T.I. Novobrantseva, G.R. Majeau, A. Amatucci, et al. // *Journal of Clinical Investigation.* – 2005. – Vol. 115 (11) – P. 3072–3082.
47. Autoimmune hepatitis induced by syngeneic liver cytosolic proteins biotransformed by alcohol metabolites / G.M. Thiele, M.J. Duryee, M.S. Willis et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2010. – Vol. 34(12). – P. 2126–36.
48. 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 / D.V. Serreze, H.D. Chapman, D.S. Varnum et al. // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184 – P. 2049–2053.
49. Baeck, C. Balance of inflammatory pathways and interplay of immune cells in the liver during homeostasis and injury / C. Baeck, F. Tacke // *EXCLI J.* – 2014. – Vol. 13. – P. 67–81.

50. Bar-Yishay, I. Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression / I. Bar-Yishay, Y. Shaul, A. Shlomai // *Liver Int.* – 2011. – Vol. 31. – P. 282–290.
51. Bataller, R. Liver fibrosis / R. Bataller, Brenner D.A. // *J Clin Invest.* – 2005. – Vol. 115(2). – P. 209-18.
52. Batey, R.G. Lymphocyte-mediated liver injury in alcohol related hepatitis / R.G. Batey, Q. Cao, B. Gould // *Alcohol.* – 2002. – Vol. 27 (1). – P. 37–41.
53. Beta-endorphin modulation of lymphocyte proliferation: effects of ethanol. / Boyadjieva N.I., Dokur M., Advis J.P. et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2002. – Vol. 26(11). – 1719–27.
54. Between Scylla and Charybdis: the role of the human immune system in the pathogenesis of hepatitis C / U. Spengler, H.D. Nischalke, J. Nattermann et al. // *World J Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 19. – P. 7852–7866.
55. Bhargava, P. Novel therapies for memory cells in autoimmune diseases / P. Bhargava // *Clin Exp Immunol.* – 2015. – Vol. 180(3). – P. 353–360.
56. Bidirectional transendothelial migration of monocytes across hepatic sinusoidal endothelium shapes monocyte differentiation and regulates the balance between immunity and tolerance in liver / H.W. Zimmermann, T. Bruns, C.J. Weston et al. // *Hepatology.* – 2015. – Vol. 63. – P. 233–246.
57. Bilzer, M. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease / M. Bilzer, F. Roggel, A. L. Gerbes // *Liver Int.* – 2006. – Vol. 26. – P. 1175–1186.
58. Binge ethanol exposure causes endoplasmic reticulum stress, oxidative stress and tissue injury in the pancreas / Z. Ren, X. Wang, M. Xu et al. // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7(34). – P. 54303–16.
59. Biochemical Evaluation of Patients of Alcoholic Liver Disease and Non-alcoholic Liver Disease / P. Torkadi, I.C. Apte, A.K. Bhute // *Indian J Clin Biochem.* – 2014 Vol. 29(1) – P. 79-83.
60. Botros, M. The de Ritis ratio: the test of time / M. Botros, K.A. Sikaris // *Clin Biochem Rev.* – 2013. – Vol. 34(3). – P.117-30.

61. Byun, J.S. Hepatic Immune Microenvironment in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Disease [Electronic resource] / J.S. Byun, H.S. Yi // *Biomed Res.* – 2017. – Mode of access: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/6862439/>
62. Byun, J.S. Involvement of hepatic innate immunity in alcoholic liver disease / J.S. Byun, W.I. Jeong // *Immune Netw.* – 2010. – Vol. 10. – P.181–187.
63. Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. / A. Louvet, F. Teixeira-Clerc, M.N. Chobert, et al, // *S. Hepatology.* – 2011. – Vol. 54(4). – P. 1217–1226.
64. Carbone, M. Autoimmune liver disease, autoimmunity and liver transplantation / M. Carbone, J.M. Neuberger // *J Hepatol.* – 2014. – Vol. 60. – P. 210–223.
65. CD141+ myeloid dendritic cells are enriched in healthy human liver / A. Kelly, R. Fahey, J. M. Fletcher et al. // *J Hepatol.* – 2014. – Vol. 60. – P. 135–142.
66. 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 / F. Matsuki, J. Saegusa, Y. Miyamoto et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2013. – Vol. 438 (4). – P. 778–783.
67. Cell fusion in the liver, revisited / M. Lizier, A.Castelli, C. Montagna et al. // *World J Hepatol.* – 2018. –Vol. 10(2).–P.213–221.
68. Celli R., Pathology of Alcoholic Liver Disease / R. Celli, X. Zhang // *JCTH.* – 2014. – Vol. 2(2). – P. 103–109.
69. Chan, L.N. Pharmacokinetic and pharmacodynamics drug interactions with ethanol (alcohol) / L.N. Chan, G.D. Anderson // *Clin. Pharmacokinet.* – 2014. – Vol. 53(12). – P. 1115–36.
70. Chan, O.T. B cells are required for lupus nephritis in the polygenic, Fas—intact MRL model of systemic autoimmunity / O.T. Chan, M.P. Madaio, M.J. Shlomchik // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 163 – P. 3592–3596.
71. Chang, J.T. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation / J.T. Chang, E.J. Wherry, A.W. Goldrath // *Nat. Immunol.* – 2014. – Vol. 15. – P. 1104–1115.
72. Changes in circulating lymphocyte subsets in alcoholic hepatopathies / P. Couzigou, P. Vincendeau, B. Fleury et al. // *Respective role of alcohol, hepatocellular*

- insufficiency and malnutrition *Gastroenterol Clin Biol.* – 1984. – Vol. 8. – P. 915–919.
73. Changes in hepatic immunoregulatory cytokines in patients with metastatic colorectal carcinoma: implications for hepatic anti-tumour immunity / A. M. Kelly, L. Golden-Mason, O. Traynor et al. // *Cytokine.* – 2006. – Vol. 35. – P. 171–179.
74. Changes in the immune system after moderate beer consumption / J. Romeo, J. Warnberg, E. Nova et al. // *Ann. Nutr. Metab.* – 2007. – Vol. 51(4). – P. 359–66.
75. Characterizing the lymphopoietic kinetics and features of hematopoietic progenitors contained in the adult murine liver in vivo [Electronic resource] / X. Jiang, Y. Chen, H. Wei et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(10) – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3793923/>
76. Chou, J.P. T cell replicative senescence in human aging. / J.P Chou., R.B. Effros // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – Vol. 19(9). – P. 1680–98.
77. Chronic alcohol consumption is associated with an increased cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver injury / F.J. Laso, J. Almeida, E. Torres et al. // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* – 2010. – Vol. 34 (5). – P. 876–85.
78. Chronic ethanol consumption inhibits hepatic natural killer cell activity and accelerates murine cytomegalovirus – induced hepatitis / H.N Pan, R. Sun, B. Jaruga et al. // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2006. – Vol. 30(9). – P.1615–23.
79. Chronic ethanol consumption modulates growth factor release, mucosal cytokine production, and microrna expression in nonhuman primates / M. Asquith, S. Pasala, F. Engelmann et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* –2013. – Vol. 38(4) – P. 980–93.
80. Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: Role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF-alpha production / V. Thakur, M.T. Pritchard, M.R. McMullen et al. // *Journal of Leukocyte Biology.* –2006. –Vol. 79(6). – P.1348–1356.
81. Chronic ethanol feeding modulates inflammatory mediators, activation of nuclear factor-kappaB, and responsiveness to endotoxin in murine Kupffer cells and circulating leukocytes. [Electronic resource] / Maraslioglu M., Oppermann E.,

- Blattner C. et al. // *Mediators Inflamm.* – 2014 Mode of access: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/808695/>
82. Chu, H. Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma / H. Chu, B. Williams, Schnabl B. // *Liver Res.* – 2018. – Vol. 2(1). – P. 43-51.
83. Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration / N. Sheron, G. Bird, J. Koskinas, et al. // *Hepatology.* – 1993. – Vol. 18(1). – P. 41–46.
84. Clinical Potential of Regulatory T Cell Therapy in Liver Diseases: An Overview and Current Perspectives / H.C. Jeffery, M. K. Braitch, S. Brown et al. // *Front Immunol.* – 2016. – Vol.7. – P. 334.
85. Cohen, J.I. Redox signaling and the innate immune system in alcoholic liver disease / J.I. Cohen, X. Chen, L.E. Nagy // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2011. – Vol. 15(2). – P. 523– 534.
86. Comparison of renal allograft outcomes in combined liver-kidney transplantation versus subsequent kidney transplantation in liver transplant recipients: analysis of UNOS database / N. Simpson, Y. W. Cho, J. C. Cicciarelli et al. // *Transplantation.* – 2006. – Vol. 82. – P. 1298–1303.
87. Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis / J.P. Teare, D. Sherman, S.M. Greenfield et al. // *Lancet.* – 1993. – Vol.342 (8876). – P. 895-8.
88. Complement and alcoholic liver disease: Role of C1q in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice / J.I. Cohen, S. Roychowdhury, M.R. McMullen et al. // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 139(2). – P. 664–674.
89. Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion / Z. M. Bamboat, L. M. Ocuin, V. P. Balachandran et al. // *J Clin Invest.* – 2010. – Vol. 120(2). – P. 559-69.
90. Crispe, I. N. The liver as a lymphoid organ / I.N. Crispe // *Annu Rev Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 147–163.
91. Crispe, I.N. Immune tolerance in liver disease / Crispe I.N. // *Hepatology.* – 2014. – Vol. 60. – P. 2109–2117.

92. Current perspectives regarding stem cell-based therapy for liver cirrhosis. [Electronic resource] / K.-A. Kwak, H.-J. Cho, J.-Y. Yang et al. // *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*. – 2018. – Mode of access: <https://www.hindawi.com/journals/cjgh/2018/4197857/>
93. Curtis, B.J. Epigenetic targets for reversing immune defects caused by alcohol exposure./ B.J. Curtis, A. Zahs, E.J. // *Kovacs Alcohol Res.* – 2013. – Vol. 35(1). – P. 97–113.
94. De Ritis ratio as diagnostic marker of alcoholic liver disease / S. Majhi, N. Baral, M. Lamsal, et al. // *Nepal Med Coll J.* – 2006. – Vol. 8(1). – P.40-2.
95. Decoding cell death signals in liver inflammation / C. Brenner, L. Galluzzi, O. Kepp et al. // *J Hepatol.* – 2013. – Vol. 59(3). – P. 583-94.
96. DePaoli, A.M. 20 years of leptin: leptin in common obesity and associated disorders of metabolism. / A.M. DePaoli // *J Endocrinol.* – 2014. – Vol. 223. – P.71–81.
97. Development of serum marker models to increase diagnostic accuracy of advanced fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: the new linki algorithm compared with established algorithms [Electronic resource] / B. Lykiardopoulos, H. Hagström, M. Fredrikson et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11 (12). – Mode of access: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0167776>
98. Diehl, A.M. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines / A.M. Diehl // *J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* –2002 –Vol. 282 – P.1–5.
99. Differential bone marrow hematopoietic stem cells mobilization in hepatectomized patient / C. Herencia, A. Rodríguez-Ariza, A. Canalejo et al. // *Gastrointest Surg.* 2011. – Vol. 15(8). –P. 1459–1467.
100. Differential expression of lymphoid and myeloid markers on differentiating hematopoietic stem cells in normal and tumor-bearing adult human liver / L. Golden-Mason, M.P. Curry, N. Nolan et al. // *Hepatology.* – 2000. – Vol. 31. – P. 1251–1256.
101. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver / T. Kenna, L. Golden-Mason, S. Norris et al. // *Clin Immunol.* – 2004. – Vol. 113. – P. 56–63.

102. Distribution of peripheral blood lymphoid subsets in alcoholic liver cirrhosis: influence of ethanol intake / F.J. Laso, J.I. Madruga, A. López, et al. // *Alcohol Clin Exp Res.* –1996. – Vol. 20. – P.1564–1568.
103. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation / A. Imhof, M. Froehlich, H. Brenner et al. // *Lancet.* – 2001. – Vol. 357(9258) – P. 763–7.
104. Effect of alcohol withdrawal on liver transaminase levels and markers of liver fibrosis / S. Campbell, P.M. Timms, P.R. Maxwell et al. // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2001. – Vol. 16 (11). – P. 1254–1259.
105. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-xL proteins / F. Hong, W.-H. Kim, Z. Tian, et al. // *Oncogene.* –2002. – Vol. 21(1). – P. –32–43
106. Endoplasmic reticulum stress, hepatocyte CD1d and NKT cell abnormalities in murine fatty livers / L. Yang, R. Jhaveri, J. Huang et al. // *Lab Invest.* – 2007. – Vol. 87. – P. 927–937.
107. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin / Y. Kamada, S. Tamura, S. Kiso et al. // *Gastroenterology.* – 2003. – Vol. 125. – P. 1796–1807.
108. Entecavir promotes CD34⁺ stem cell proliferation in the peripheral blood and liver of chronic hepatitis B and liver cirrhosis patients / Lv B., Zhao H., Bai X., et al. // *Discov Med.* –2014. – Vol. 18(100). – P. 227 – 36.
109. Ethanol suppresses cytokine responses induced through Toll-like receptors as well as innate resistance to *Escherichia coli* in a mouse model for binge drinking. / S.B. Pruett, Q. Zheng, R.P. Fan et al. // *Alcohol.* 2004. – Vol. 33(2). – P. 147–55.
110. Ethanol-induced dysfunction of hepatocytes and leukocytes in patients without liver failure / M. Gheorghiu, C. Bara, D. Pasarica et al. // *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* – 2004. – Vol. 63(1–2). – P. 5–33.
111. Ex vivo analysis of resident hepatic pro-inflammatory CD1d-reactive T cells and hepatocyte surface CD1d expression in hepatitis C / K. Yanagisawa, S. Yue, H. van der Vliet et al. // *J Viral Hepat.* – 2013. – Vol. 20. – P. 556–565.

112. Expansion of innate CD5pos B cells expressing high levels of CD81 in hepatitis C virus infected liver / M.P. Curry, L. Golden-Mason, D.G. Doherty et al. // *J Hepatol.* – 2003. – Vol. 38. – P. 642–650.
113. Expansions of CD8+CD28- and CD8+TcRVbeta5.2+ T cells in peripheral blood of heavy alcohol drinkers / F.A. Arosa, G. Porto, J.M. Cabeda et al. // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2000. – Vol. 24. – P. 519–527.
114. Farber, D.L. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis / D.L. Farber, N.A. Yudanin, N.P. Restifo // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – Vol. 14(1). – P. 24—35.
115. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration / Y. Malato, S. Naqvi, N. Schürmann et al. // *J Clin Invest.* – 2011. – Vol. 121. – P. 4850–4860.
116. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells / T. Csak, M. Ganz, J. Pespisa et al. // *Hepatology.* – 2011. – Vol. 54. – P.133–144.
117. FcalphaRI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity / M. van Egmond, E. van Garderen, A.B. van Spriel et al. // *Nat Med.* – 2000. –Vol.6. – P. 680–685.
118. Filipe, A. Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche / A. Filipe, J. McLauchlan // *Trends Mol Med.* – 2015. – Vol. 21. P. 34–42.
119. Fine T-cell subsets in alcoholics as determined by the expression of L-selectin, leukocyte common antigen, and beta-integrin. / R.T. Cook, T.J. Waldschmidt, Z.K. Ballas et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1994. – Vol. 18(1). – P. 71–80.
120. Focus On: Alcohol and the Immune System / P.E. Molina, K.I. Happel, P. Zhang et al. // *Alcohol Research & Health.* – 2010. – Vol. 33(1-2). – P. 97–108.
121. Friedman, S.L. Reversal of hepatic fibrosis – fact or fantasy? / S.L. Friedman, M.B. Bansal // *Hepatology.* – 2006. – Vol. 43. – P. 82–88.
122. Gabrilovich, D.I. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system / D.I. Gabrilovich, S. Nagaraj // *Nat Rev Immunol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 162–174.

123. Gao, B. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets / B. Gao, R. Bataller // *Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 141(5). – P. 1572–1585.
124. Gao, B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease/ B. Gao // *JGH*. – 2012. – Vol. 27. – P. 89–93.
125. Gao, B. Liver: an organ with predominant innate immunity / B. Gao, W. I. Jeong, Z. Tian // *Hepatology*. – 2008. – Vol. 47. – P. 729–736.
126. Granulocytecolony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure / V. Garg, H.Garg, A. Khan, et al. // *Gastroenterology*. –2012. – Vol. 142(3). – P.505–512.
127. Gregory, S. H. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections / S. H. Gregory, E. J. Wing // *J Leukoc Biol*. – 2012. – Vol. 72. – P. 239–248.
128. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. / Y.Y. Jang, M.I. Collector, S.B. Baylin et al. // *Nat Cell Biol*. –2004. – Vol. 6(6). – P.532–539.
129. Hepatic acute phase response protects the brain from focal inflammation during postnatal window of susceptibility / I. Sá-Pereira, J. Roodselaar, Y. Couch et al. // *Brain Behav Immun*. – 2018. – Vol. 69. – P. 486-498.
130. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function / L. E. Sander, S. D. Sackett, U. Dierssen et al. // *J Exp Med*. – 2010. – Vol. 207. – P. 1453–1464.
131. Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice / K. Tomita, Y. Oike, T. Teratani et al. // *Hepatology*. – 2008. – Vol. 48(2). – P. 458–73.
132. Hepatic expression of CCL2 in alcoholic liver disease is associated with disease severity and neutrophil infiltrates. / D. Dégre, A. Lemmers, T. Gustot et al. // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2012. – Vol. 169(3). – P. 302–310.
133. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. / C. Guyot, S. Lepreux, C. Combe, et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. –2006. – Vol.38. – P.135–151.

134. Hepatic interleukin 15 (IL-15) expression: implications for local NK/NKT cell homeostasis and development / L.A. Golden-Mason, M. Kelly, D.G. Doherty et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2004. – Vol. 138. – P. 94–101.
135. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. / K.R. Karlmark, R. Weiskirchen, H.W. Zimmermann et al. // *Hepatology.* –2009. – Vol. (1). – P. 261-74.
136. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders / S. Ichikawa, D. Mucida, A. J. Tyznik et al. // *J Immunol.* – 2011. – Vol. 186. – P. 5549–5555.
137. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral–blood stem cells / M. Körbling, R.L. Katz, A. Khanna et al. // *N Engl J Med.* –2002. – Vol.346 (10). – P. 38–46.
138. Hernandez-Gea, V. Pathogenesis of liver fibrosis / V. Hernandez-Gea, S.L. Friedman // *Annual Review of Pathology.* – 2011. – Vol. 6. – P. 425–456.
139. Higuchi H., Gores G.J. Mechanisms of liver injury: an overview // *Curr Mol Med.* 2003. V. 3 (6). P. 483–490.
140. Human liver infiltrating $\gamma\delta$ T cells are composed of clonally expanded circulating and tissue-resident populations / S. Hunter, C. R. Willcox, M. S. Davey et al. // *J Hepatol.* – 2018. – Vol. 69(3). – P. 654-665.
141. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161^{hi} IL-17-secreting T cells / M. Dusseaux, E. Martin, N. Serriari et al. // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – P. 1250–1259.
142. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF- α /IL-6 in mice / N. Selzner, M. Selzner, B. Odermatt // *Gastroenterology.* – 2003. – Vol. 124. – P. 692–700.
143. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice / J. Petrasek, S. Bala, T. Csak, et al. // *Journal of Clinical Investigation.* – 2012. – Vol. 122(10). – P. 3476–3489.
144. Immune cell regulation of liver regeneration and repair / D. Markose, P. Kirkland, P. Ramachandran et al. // *Journal of Immunology and Regenerative Medicine.* – 2018. – Vol. 2. – P. 1–10.

145. Immune regulation of intrahepatic regulatory t cells in fibrotic livers of mice / X. Zhang, J. Lou, L. Bai et al. // *Med Sci Monit.* – 2017. – Vol. 23. – P. 1009–1016.
146. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin–10 from hepatocytes / R. Safadi, M. Ohta, C.E. Alvarez et al. // *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 127. – P. 870–882.
147. Immunosuppressive functions of hepatic myeloid-derived suppressor cells of normal mice and in a murine model of chronic hepatitis B virus / S. Chen, S. M. F. Akbar, M. Abe et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2011. – Vol. 166. – P. 134–142.
148. Impaired immunoglobulin M production by incubation of hybridoma cells with ethanol / E. Muhlbauer, U. Karsten, M. Rottmann et al. // *Alcohol* 2001. – 24(3). – P. 179–87.
149. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthasedeficient mice / R. M. Rai, F. Y. Lee, A. Rosen et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 13829–13834.
150. Impairment of liver regeneration correlates with activated hepatic NKT cells in HBV transgenic mice / Z. Dong, J. Zhang, R. Sun et al. // *Hepatology.* – 2007. – Vol. 45. – P. 1400–1412.
151. In vitro studies of enhanced IgG synthesis in severe alcoholic liver disease / J.R. Wands, J.L. Dienstag, J.R. Weake et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 1981. – Vol. 44(2). – P. 396–404.
152. Increased immunoglobulin A in alcoholic liver cirrhosis: exploring the response of B cells to Toll-like receptor 9 activation / B. Massonnet, A. Delwail J.-M. Ayrault // *Clinical and Experimental Immunology.* – 2009. – Vol. 158(1) – P. 115– 124.
153. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts / R. Y. Calne, R. A Sells, J. R. Pena et al. // *Nature.* – 1969. – Vol. 223. – P. 472–476.
154. Inflammation in alcoholic liver disease / H.J. Wang, B. Gao, S. Zakhari et al. // *Annual Review of Nutrition.* – 2012. – Vol. 32. – P. 343–368.
155. Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis / B. Gao, M.F. Ahmad, L.E. Nagy et al. // *J Hepatol.* – 2019. – Vol. 70(2). – P. 249-259.
156. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver

- disease: a pilot randomized controlled study. / A.C. Lyra, M.B. Soares, L.F. da Silva, et al. // *Eur. J. Gastroenterol. and Hepatol.* – 2010. – Vol. 22(1). – P. 33–42.
157. Inhibition of Kupffer Cells reduced CXC chemokine production and liver injury / B. Mosher, R. Dean, J. Harkema et al. // *J Surg Res.* – 2001. – Vol. 99. – P. 201–210.
158. Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production / Mandrekar P., Catalano D., Dolganiuc A. et al. // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173(5). – P.3398–407.
159. Inhibition of TLR8- and TLR4-induced Type I IFN induction by alcohol is different from its effects on inflammatory cytokine production in monocytes. [Electronic resource] / Pang M., Bala S., Kodys K. et al. // *BMC Immunol.* –2011. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3203086/>.
160. Innate immunity in alcoholic liver disease / B. Gao, E. Seki, D.A. Brenner et al. // *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology.* – 2011. – Vol. 300(4). – P. 516–525.
161. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases [Electronic resource] / S. Li, M. Hong, H. Y. Tan et al. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – Mode of access: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/4234061/>
162. Intake of wine, beer, and spirits and the risk of clinical common cold / B. Takkouche, C. Regueira-Méndez, R. García-Closas et al. // *Am. J. Epidemiol.* – 2002. – Vol. 155(9). – P. 853–8.
163. Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin / S. Goddard, J. Youster, E. Morgan et al. // *Am J Pathol.* – 2004. – Vol.164. – P. 511–519.
164. Interleukin-6 is an important mediator for mitochondrial DNA repair after alcoholic liver injury in mice/ X. Zhang, S. Tachibana, H. Wang, et al. *Hepatology.* – 2010– Vol. 52(6). – P. 2137–2147.
165. J.L Steiner. Alcohol, Adipose Tissue and Lipid Dysregulation / J. L. Steiner, Lang C.H. // *Biomolecules.* – 2017.–Vol. 7(1). – P.1–16.
166. Jaeschke, H. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis / H. Jaeschke // *Alcohol.* –2002. – Vol.27– P.23–27.

167. Janeway, C. *Janeway's Immunobiology*. / C. Janeway // New York: Garland Science; Taylor & Francis Group, LLC, 2008.
168. Jeong, W.I. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon- γ contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis / W.I. Jeong, O. Park, B. Gao // *Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 134. – P. 248–258.
169. Jeong, W.I. Innate immunity and alcoholic liver fibrosis / W.I. Jeong, B. Gao // *J Gastroenterol Hepatol*. – 2008. – Vol. 23 (1). – P. 112–118.
170. Jerrells, T.R. Role of activated CD8+ T cells in the initiation and continuation of hepatic damage / T.R. Jerrells // *Alcohol*. – 2012. – Vol. 27 (1). – P. 47–52.
171. Jimenez, V.A. Studies using macaque monkeys to address excessive alcohol drinking and stress interactions / V.A. Jimenez, K.A. Grant // *Neuropharmacology* – 2017. – Vol. 122. – P. 127–35.
172. Kim, M.J. Globular adiponectin inhibits ethanol-induced reactive oxygen species production through modulation of NADPH oxidase in macrophages: involvement of liver kinase B1/AMP-activated protein kinase pathway / M.J. Kim, L.E. Nagy, P. H. Park // *Mol Pharmacol*. – 2014. – Vol. 86. – P.284–296.
173. Kindlin-2 regulates hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis [Electronic resource] / J. Yu, Y. Hu , Y. Gao et al. // *Cell Death Discov*. – 2018. – Mode of access: <https://www.nature.com/articles/s41420-018-0095-9>
174. Kishore, R. Stabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA by chronic ethanol: role of A + U-rich elements and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. / R. Kishore, M.R. McMullen, L.E. Nagy // *J. Biol. Chem*. – 2001. – Vol. 276(45). – P. 41930–7.
175. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4 / G.L. Su, R.D. Klein, A. Aminlari et al. // *Hepatology*. – 2000. – Vol. 31. – P. 932–936.
176. Kupffer cell-monocyte communication is essential for initiating murine liver progenitor cell-mediated liver regeneration / C.L. Elsegood, C.W. Chan, M.A. Degli-Esposti et al. // *Hepatology*. – 2015. – Vol. 62. – P. 1272–1284.
177. Lange C.M., Moreau R. Immunodysfunction in Acute-on-Chronic Liver Failure / C.M. Lange, R. Moreau // *Visc Med*. – 2018. – Vol. 34(4). – P. 276–282.

178. Lau, A. Ethanol affects the generation, cosignaling molecule expression, and function of plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets in vitro and in vivo./ A. Lau, M. Abe, A. Thomson // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – Vol. 79(5). – P. 941–53.
179. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals / K. Ikejima, H. Honda, M. Yoshikawa et al. // *Hepatology.* – 2001. – Vol. 34. – P. 288–297.
180. Leptin deficiency contributes to the pathogenesis of alcoholic fatty liver disease in mice. / X. Tan, X. Sun, Q. Li, et al. // *Am J Pathol.* – 2012. – Vol. 181(4). – P. 1279–86.
181. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway / S.S. Choi, W.K. Syn, G.F. Karaca et al. // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285(47). – P. 36551–60.
182. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat / K. Ikejima, Y. Takei, H. Honda et al. // *Gastroenterology.* – 2002. – V. 122. – P.1399–1410.
183. Lerut, J. An appraisal of tolerance in liver transplantation / J. Lerut, A. Sanchez-Fueyo // *Am J Transplant.* – 2006. – Vol. 6. – P. 1774–1780.
184. Lieber, C.S. Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis / C.S. Lieber // *Alcohol.* – 2004. – Vol. 34(1). – P. 9–19.
185. Lieber, C.S. Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease / C.S. Lieber, D.G. Weiss, F. Paronetto // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2008. – Vol. 32 (6). – P. 1031–1039.
186. Lindquist, J.A. Cold shock proteins: from cellular mechanisms to pathophysiology and disease / J. A. Lindquist, P. R. Mertens // *Cell Commun Signal.* – 2018. – Vol. 16(1). – P. 63.
187. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice / D.E. Cressman, L.E. Greenbaum, R.A. DeAngelis et al. // *Science.* – 1996. – Vol. 274. – P. 1379–1383.
188. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ / A. Pellicoro, P. Ramachandran, J.P. Iredale et al. // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – Vol. 14. – P. 181–194.

189. Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury / E. Bourbonnais, V. A. Raymond, C. Ethier et al. // *Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 142. – P. 130–139.
190. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells / F. Heymann, J. Peusquens, I. Ludwig-Portugall et al. // *Hepatology*. – 2015. – Vol. 62. – P. 279–291.
191. Liver-primed memory T cells generated under noninflammatory conditions provide anti-infectious immunity / J. P. Böttcher, O. Schanz, D. Wohlleber et al. // *Cell Rep*. – 2013. – Vol. 3. – P. 779–795.
192. Long lasting immunological effects of ethanol after withdrawal. / F. J. Laso, J. I. Madruga, J. F. San Miguel et al. // *Cytometry*. – 1996. – Vol. 26 – P. 275–280.
193. Long– term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34+ cells in patients with chronic liver disease / Levicar N., Pai M., Habib N.A., et al. // *Cell Prolif*. – 2008. – Vol. 41(1). – P. 115–25.
194. Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIIINP compared with MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon-alpha and ribavirin / C. Trocme, V. Leroy, N. Sturm, et al. // *J Viral Hepat*. – 2006. – Vol. 13 (10). – P. 643–651.
195. Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin / A. De Creus, M. Abe, A.H. Lau et al. // *J Immunol*. – 2005. – Vol. 174. – P. 2037–2045.
196. Lymphocyte measures in treatment-naïve 13-15-year old adolescents with alcohol use disorders / C.E. Naude, P. Bouic, M. Senekal et al. // *Alcohol*. – 2011. – Vol. 45. – P. 507–514.
197. Lymphocyte subsets in alcoholic liver disease / L. C. Matos, P. Batista, N. Monteiro et al. // *World Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 5(2). – P. 46–55.
198. Macrophage migration inhibitory factor contributes to ethanol-induced liver injury by mediating cell injury, steatohepatitis, and steatosis / M.A. Barnes, M.R. McMullen, S. Roychowdhury et al. // *Hepatology*. – 2013. – Vol. 57(5). – P. 1980–1991.

199. MAIT cells: new guardians of the liver [Electronic resource] / A. Kurioka, L.J. Walker, P. Klenerman et al. // *Clin Transl Immunology*. – 2016. – Vol. 5(8). – Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/cti.2016.51>.
200. Malondialdehydeacetaldehyde (MAA) adducted surfactant protein induced lung inflammation is mediated through scavenger receptor a (SR-A1) / M. Sapkota, J.M. DeVasure, K.K. Kharbanda et al. // *Respir. Res.* – 2017. – Vol. 18(1). – P. 36.
201. Mandrekar, P. Epigenetic regulation in alcoholic liver disease / P. Mandrekar // *World Journal of Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 17(20). – P. 2456–2464.
202. Mandrekar, P. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. / P. Mandrekar, G. Szabo // *Journal of Hepatology*. –2009. – Vol. 50(6). – P.1258–1266.
203. Maternal Alcohol Use and Nutrition During Pregnancy: Diet and Anthropometry / R.C. Carter, M. Senekal, N.C. Dodge et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2017. – Vol. 41(12). – P. 2114–27.
204. McClain, C.J. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis / C.J. McClain, D.A. Cohen // *Hepatology*. – 1989. Vol. 9(3). – P. 349–351.
205. Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells / L. J. Pallett, U. S. Gill, A. Quaglia et al. // *Nat Med*. – 2015. – Vol. 21. – P. 591–600.
206. Michalopoulos, G.K. Liver regeneration / G.K. Michalopoulos // *J Cell Physiol*. – 2007. – Vol. 213. – P. 286–300.
207. Moderate alcohol consumption alters both leucocyte gene expression profiles and circulating proteins related to immune response and lipid metabolism in men / M.M. Joosten, M.J. van Erk, L. Pellis et al. // *Br. J. Nutr.* – 2012. – Vol. 108(4). – P. 620–7.
208. Moderate alcohol induces stress proteins HSF1 and HSP70 and inhibits proinflammatory cytokines resulting in endotoxin tolerance / S. Muralidharan, A. Ambade, M.A. Fulham et al. // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 193(4). – P. 1975–87.
209. Modulation of liver injury by interleukin-10 / H. Louis, O. Le Moine, M. Goldman, J. Devière / *Acta Gastroenterol Belg* // 2003. – Vol. 66(1). – P. 7-14.

210. Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics / R.T. Cook, Z.K. Ballas, T.J. Waldschmidt et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1995. – Vol. 19(3). – P. 555–63.
211. Molecular characterization of B cell clonal expansions in the liver of chronically hepatitis C virus-infected patients / V. Racanelli, D. Sansonno, C. Piccoli et al. // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 21–29.
212. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines / A.M. Miller, N. Horiguchi, W.I. Jeong et al. // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2011. – Vol. 35 (5). – P. 787–793.
213. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) / A. Bertola, S. Mathews, S.H. Ki et al. // *Nat. Protocols.* –2013. – Vol. 8(3). – P. 627–37.
214. Murine liver plasmacytoid dendritic cells become potent immunostimulatory cells after Flt-3 ligand expansion / T.P. Kingham, U.I. Chaudhry, G. Plitas et al. // *Hepatology.* – 2007. – Vol. 45. – P. 445–454.
215. Murine models of acute alcoholic hepatitis and their relevance to human disease / R.J. Wilkin, P.F. Lalor, R. Parker, et al. // *Am J Pathol.* – 2016. – Vol. 186. – P.748–60.
216. Nagy, L.E. The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease / L.E. Nagy // *Alcohol Research: Current Reviews.* - 2015. – Vol. 37(2). P. 237-50.
217. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners / S. Radaeva, R. Sun, B. Jaruga et al. // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 130. – P. 435–452.
218. Nemeth, E. Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol* / E. Nemeth, A. W. Baird, C. O’Farrelly // *Semin Immunopathol.* – 2009. – Vol. 31(3). – P. 333–343.
219. Neupane, S.P. Neuroimmune Interface in the Comorbidity between Alcohol Use Disorder and Major Depression / S.P. Neupane // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 655.
220. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent

- manner / A. Glässner, M. Eisenhardt, B. Krämer et al. // *Lab Invest.* – 2012. – Vol. 92. – P. 967–977.
221. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells / T. Kenna, L. Golden-Mason, S. A. Porcelli et al. // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 1775–1779.
222. Novel mechanism of C-reactive protein for enhancing mouse liver innate immunity / A. Inatsu, M. Kinoshita, H. Nakashima et al. // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 49. – P. 2044–2054.
223. O’Keefe, J.H. Alcohol and cardiovascular health: the razor-sharp double-edged sword / J.H. O’Keefe, K.A. Bybee, C.J. Lavie // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. – Vol. 50(11). – P. 1009–14.
224. O’Keefe M., Human dendritic cell subsets and function in health and disease. / M. O’Keefe, W.H. Mok, K. Radford // *J. Cell. Mol. Life Sci.* – 2015. – Vol. 72(22). – P. 4309–25.
225. O’Neill, L. A. J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function / L. A. J. O’Neill, E.J. Pearce // *J Exp. Med.* – 2015. – Vol. 213. – P. 15–23.
226. Opposing effects of alcohol on the immune system / Barr T., Helms C., Grant K. et al. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* –2016. – Vol. 65. – P. 242-51.
227. Orman, E.S. Alcoholic liver disease: Pathogenesis, management, and novel targets for therapy [Electronic resource] / E.S. Orman, G. Odena, R. Bataller // *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* – 2013. – Mode of access: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jgh.12030>
228. Pasala, S. impact of alcohol abuse on the adaptive immune system / S. Pasala, T. Barr, I. Messaoudi // *Alcohol Res.* – 2015. – Vol. 37(2). – P. 185—197.
229. Pathological mechanisms of alcohol-induced hepatic portal hypertension in early stage fibrosis rat model / J. Li, J.Z. Niu, J.F. Wang, et al. // *World J Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11 (41). – P. 6483–6488.
230. Peng, H. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity / H. Peng, E.Wisse, Z.Tian // *Cell Mol Immunol.* – 2016. Vol. 13. – P. 328–36.
231. Percival, S.S. Wine modifies the effects of alcohol on immune cells of mice. / S.S. Percival, C.A. Sims // *J. Nutr.* – 2000. – Vol. 130(5) – P.1091–4.

232. Peripheral blood CD3 and CD4 T-lymphocyte reduction correlates with severity of liver cirrhosis / L. Lombardo, A. Capaldi, G. Poccardi et al. // *Int J Clin Lab Res.* – 1995. – Vol. 25. – P. 153–156.
233. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-Cells. / Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A. et al. // *Tsitologiya.* – 2015. – Vol. 57(5). – P. 311–8.
234. Plasma proteomic alterations in non-human primates and humans after chronic alcohol self-administration / W.M. Freeman, H.D. Vanguilder, E. Guidone et al. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2011. – Vol. 14(7). – P. 899–911.
235. Poor allostimulatory function of liver plasmacytoid DC is associated with proapoptotic activity, dependent on regulatory T cells / D. Tokita, T.L. Sumpter, G. Raimondi et al. // *J Hepatol.* – 2008. – Vol. 49. – P. 1008–1018.
236. Portal venous velocity affects liver regeneration after right lobe living donor hepatectomy [Electronic resource] / C. T. Hou, Y. L. Chen, C. C. Lin // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13(9) – Mode of access: <https://www.x-mol.com/paper/819935>
237. Possible mechanism of acute effect of ethanol on intestinal IgA expression in rat / M. Budec, V. Koko, V. Todorovic et al. // *Int. Immunopharmacol.* – 2007. – Vol. 7(6). – P. 858–63.
238. Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; and Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease / R.S. O'Shea, S. Dasarathy, A.J. McCullough // *Hepatology.* – 2010. – Vol. 51(1). – P.307–328.
239. Prolonged ethanol treatment enhances lipopolysaccharide/phorbol myristate acetate-induced tumor necrosis factor-alpha production in human monocytic cells / Z. Zhang, G.J. Bagby, D. Stoltz et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2001. – Vol. 25(3). – P. 444–9.
240. Protzer, U. Living in the liver: hepatic infections / U. Protzer, M. K. Maini, P. A. Knolle // *Nat Rev Immunol.* – 2012. – Vol. 12. – P. 201–213.
241. Pruetz, B. An explanation for the paradoxical induction and suppression of an acute phase response by ethanol. / Pruetz B., Pruetz S. // *Alcohol.* – 2006. – Vol. 39(2). – P. 105–10.

242. Rahmouni, K. Endothelial effects of leptin: Implications in health and diseases / K. Rahmouni W. G. Haynes // *Curr Diab Rep.* – 2005. – Vol. 5. – P 260.
243. Ramaiah, S. Early-phase alcoholic liver disease: an update on animal models, pathology, and pathogenesis / S. Ramaiah, C. Rivera, G. Arteel // *Int J Toxicol.* – 2004. – Vol. 23 (4). – P. 217– 231.
244. Regulatory CD4+ T cells modulate the interaction between NK cells and hepatic stellate cells by acting on either cell type / B. Langhans, A.W. Alwan, B. Krämer et al. // *J Hepatol.* – 2015. – Vol. 62(2). – P. 398–404.
245. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue / Lynch L., Michelet X., Zhang S. et al. // *Nat Immunol.* – 2015. – Vol. 16. – P. 85–95.
246. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes / S. Norris, C. Collins, D. Doherty et al. // *J Hepatol.* – 1998. – Vol. 28. – P. 84–90.
247. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice / J.M. Ajmo, X. Liang, C. Q. Rogers et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. 833–842.
248. Reversal of murine alcoholic steatohepatitis by pepducin-based functional blockade of interleukin-8 receptors / V. Wieser, T.E. Adolph, B. Enrich et al. // *Gut.* – 2016. –Vol. 66(5) P. – 930-938.
249. Robinson, M.W. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis / M. W. Robinson, C. Harmon, C. O'Farrelly // *Cell Mol Immunol.* – 2016. – Vol. 13(3). – P. 267–76.
250. Salama, H. Autologous CD34+ and CD133+ stem cells transplantation in patients with end stage liver disease. / H. Salama, A.R. Zekri, A.A. Bahnassy // *World J Gastroenterol.* – 2010. – Vol.16 (42). – P. 5297–5305.
251. Schwartz, J.M. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease. / J.M. Schwartz, J.F. Reinus // *Clinics in Liver Disease.* – 2012. – Vol. 16(4). – P. 659–666.
252. Seki, E. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: Crosstalk between the liver and gut / E. Seki, B. Schnabl // *Journal of Physiology.* – 2012. – Vol. 590(3). – P. 447–458.

253. Seki, E. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update / E. Seki, D. Brenner // *Hepatology*. – 2008. – Vol. 48. – P. 322–335.
254. Serum interleukin-6 and tumor necrosis factor- α are associated with early graft regeneration after living donor liver transplantation [Electronic resource] / M. S. Chae, K. U. Moon, H. S. Chung et al. // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13(4). – Mode of access: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0195262>
255. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. / A. Gonzalez-Quintela, R. Alende, F. Gude et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2008. – Vol. 151(1). – P. 42–50.
256. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease / C. Nøjgaard, J.S. Johansen, E. Christensen et al. // *J Hepatol.* – 2003. – Vol. 39 (2). – P. 179–186.
257. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study / W.M. Rosenberg, M. Voelker, R. Thiel et al. *Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 127 (6). – P. 1704–13.
258. Shear wave elastography in hepatitis C patients before and after antiviral therapy / T. Suda, O. Okawa, R. Masaoka // *World J Hepatol.* – 2017. – Vol. 9 (1). – P. 64–68.
259. Significance of serum adiponectin levels in patients with chronic liver disease / M.L. Balmer, J. Joneli, A. Schoepfer, et al. // *Clin Sci (Lond)*. – 2010. – Vol 5, N 119(10). – P. 431–6.
260. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations [Electronic resource] / S.A. MacParland, J.C. Liu, X.Z. Ma et al. // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9(1). – Mode of access: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-06318-7>
261. Slukvin, I.I. Different pathways of in vitro ethanol-induced apoptosis in thymocytes and splenic T and B lymphocytes. / I.I. Slukvin, T.R. Jerrells // *Immunopharmacology*. – 1995. – Vol. 31(1). – P. 43–57.
262. Soluble ligands and their receptors in human embryo development and implantation / G. A. Thouas, F. Dominguez, M. P. Green et al. // *Endocr Rev.* – 2015. – Vol. 36. – P. 92–130.

263. Ströhle, A. Alcohol intake--a two-edged sword. Part 1: metabolism and pathogenic effects of alcohol / A. Ströhle, M Wolters, A. Hahn // *Med. Monatsschr. Pharm.* – 2012. – Vol. 35(8). – P. 281–92.
264. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . / G. M. Tannahill, A. M. Curtis, J. Adamik et al. // *Nature*. – 2013. – Vol. 496. – P. 238–242.
265. Summary of the 2018 Alcohol and Immunology Research Interest Group (AIRIG) meeting / P.V. Kuprys, H. Tsukamoto, B. Gao, et al. // *Alcohol*. – 2018. –Vol.77– P. 11-18.
266. Systematic review: microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease / A. Wieland, D.N. Frank, B. Harnke et al. // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2015. – Vol. 42(9). – P. 1051– 63.
267. Szabo, G. Inflammasomes in liver diseases / G. Szabo, T. Csak // *Journal of Hepatology*. – 2012. – Vol. 57(3). – P. 642–654.
268. Szuster-Ciesielska, A. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells / A. Szuster-Ciesielska, M. Kandeferszerszeń // *Pharmacol Rep.* – 2005. – Vol. 57(5). – P.588-95.
269. Tacke, F. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury / F. Tacke, T. Luedde, C. Trautwein // *Clin Rev Allergy Immunol.* – 2009. – Vol. 36(1). – P. 4-12.
270. Tacke, F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. / F. Tacke // *J Hepatol.* – 2017. – Vol. 66(6). – P. 1300-1312.
271. Takeuchi, O. Pattern recognition receptors and inflammation / O. Takeuchi, S. Akira // *Cell*. – 2010. – Vol.140. – P. 805–820.
272. Tall, A. R. Cholesterol, inflammation and innate immunity / A. R. Tall, L. Yvan-Charvet // *Nat Rev Immunol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 104–116.
273. Taurine supplementation prevents ethanol-induced decrease in serum adiponectin and reduces hepatic steatosis in rats / X. Chen, B.M. Sebastian, H. Tang et al. // *Hepatology*. –2009. – Vol. 49. – P.1554–1562.
274. Teschke, R. Alcoholic Liver Disease: Alcohol Metabolism, Cascade of Molecular Mechanisms, Cellular Targets, and Clinical Aspects / R Teschke // *Biomedicines*. – 2018. – Vol. 6(4).– P. 106.

275. The activation state of human intrahepatic lymphocytes / Z. Tu, A. Bozorgzadeh, I. N. Crispe et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2007. – Vol. 149. – P. 186–193.
276. The associations of alcohol drinking and drinking cessation to measures of the immune system in middleaged men. / F. Mili, W.D. Flanders, J.R. Boring et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 1992. – Vol. 16(4). – P. 688–94.
277. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. / I. Hritz, P. Mandrekar, A. Velayudham, et al. // *Hepatology.* – 2008. – Vol. 48(4). – P.1224–1231.
278. The Effect of Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease [Electronic resource] / H. Kawaratani, T. Tsujimoto, A. Douhara, et al. // *Mediators of Inflammation.* – 2013. – Mode of access: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/495156/>
279. The generation of antibody—secreting plasma cells / S.L. Nutt, P.D. Hodgkin, D.M. Tarlinton et al. // *Nat Rev Immunol.* – 2015. – Vol. 15 (3). – P. 160–71.
280. The influence of methylprednisolone on the ability of CD4+CD95+HLA-DR+ Tcells to produce proinflammatory medators in cultures of TCR-activate CD3+CD45RO+ T-lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. / Todosenko N.M., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A. et al. // *Biomed. Khimiya.* – 2017. – Vol. 63(3). – P. 255–65.
281. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. /A. Lemmers, C. Moreno, T. Gustot, et al. // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 49(2). – P. 646–657.
282. The interplay between Th17 and T-regulatory responses as well as adipokines in the progression of non-alcoholic fatty liver disease / M. Świdarska, J. Jaroszewicz, A. Stawicka et al. // *Clin Exp Hepatol.* – 2017. – Vol. 3(3). – P. 127-134.
283. The opposite effects of acute and chronic alcohol on lipopolysaccharide-induced inflammation are linked to IRAK-M in human monocytes / P. Mandrekar, S. Bala, D. Catalano et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183(2). – P. 1320–7
284. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration / C. W. Strey, M. Markiewski, D. Mastellos et al. // *J Exp Med.* – 2003. – Vol. 198. – P. 913–923.

285. The role of serum hyaluronic acid determination in the diagnosis of liver fibrosis / M. Gudowska, B. Cylwik, L. Chrostek // *Acta Biochim Pol.* – 2017. – Vol. 64 (3). – P. 451–457.
286. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity / D.G. Bowen, M. Zen, L. Holz et al. // *J Clin Invest.* – 2004. – Vol. 114. – P. 701–712.
287. The unfolding web of innate immune dysregulation in alcoholic liver injury. / G. Szabo, P. Mandrekar, J. Petrasek, et al. // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* – 2011. – Vol. 35(5). – P. 782–786.
288. Thomson, A. W. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment / A. W. Thomson, P. A. Knolle // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 753–766.
289. Tilg, H. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis / H. Tilg, A.R. Moschen // *Hepatology.* – 2010. – Vol. 52. – P. 1836–1846.
290. TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells / Z. Tu, A. Bozorgzadeh, R. H. Pierce et al. // *J Exp Med.* – 2008. – Vol. 205. – P. 233–244.
291. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice / K. Miura, L. Yang, N. van Rooijen et al. // *Hepatology.* – 2013. – Vol. 57. – P. 577–589.
292. Toll-like receptor 4 mediates alcohol-induced steatohepatitis through bone marrow-derived and endogenous liver cells in mice / S. Inokuchi, H. Tsukamoto, E. Park et al. // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* – 2011. – Vol. 35(8). – P. 1509–1518.
293. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals / M.K. Vidya, V.G. Kumar, V. Sejian et al. // *Int. Rev. Immunol.* – 2017. – Vol. 13. – P. 1–17.
294. Trahtenberg, U. Apoptotic Cells Induced Signaling for Immune Homeostasis in Macrophages and Dendritic Cells [Electronic resource] / Trahtenberg U., Mevorach D. // *Front. Immunol.* – 2017. Mode of access: <https://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.01356>

295. Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation // Rabe B, Chalaris A, May U, et al. // *Blood*. – 2008. – Vol. 111(3). – P. 1021–1028
296. Tuma, D.J. Dangerous byproducts of alcohol breakdown-focus on adducts / D.J. Tuma, C.A. Casey // *Alcohol Res. Health*. – 2003. – Vol. 27(4). – P. 285–90.
297. Udomsinprasert, W. Adiponectin as a novel biomarker for liver fibrosis / W. Udomsinprasert, S. Honsawek, Y. Poovorawan // *World J Hepatol*. – 2018. – Vol. 10(10). – P.708–718.
298. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells / S. Aleffi, I. Petrai, C. Bertolani et al. // *Hepatology*. – 2005. – Vol. 42. – P.1339–1348.
299. Vonghia, L. Cross talk of the immune system in the adipose tissue and the liver in non-alcoholic steatohepatitis: Pathology and beyond / L. Vonghia, S. Francque // *World J Hepatol*. – 2015. – Vol. 7. – P. 1905–1912.
300. Waldschmidt, T.J. Alcohol and Inflammation & Immune Responses: Summary of the 2006 Alcohol and Immunology Research Interest Group (AIRIG) meeting / T.J. Waldschmidt, R.T. Cook, E.J. Kovacs // *Alcohol (Fayetteville, NY)*. – 2008. – Vol. 42 (2). – P. 137–142.
301. Wang, J. Chemokine signaling in development and disease / J. Wang, H. Knaut // *Development*. – 2014. – Vol. 141(22). – P. 4199–205.
302. Who is at risk? Population characterization of alcohol self-administration in nonhuman primates helps identify pathways to dependence. / K.A. Grant, J. Stafford, A. Thiede et al. // *Alcohol Res. Health*. – 2008. – Vol. 31(4). – P. 289–97.
303. Wilson, G. K. Hypoxia inducible factors in liver disease and hepatocellular carcinoma: current understanding and future directions / G. K. Wilson, D.A. Tennant, J. A. McKeating // *J Hepatol*. – 2014. – Vol. 61. – P. 1397–1406.
304. World Health Organization. World Health Report 2011: Global status report on alcohol and health. Switzerland [Electronic resource]. – 2011. – Mode of access:https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44499/9789241564151_eng.pdf;jsessionid=7F06813BA2BACD5A48CEED4AAE528F62?sequence=1
305. Wound repair: role of immune-epithelial interactions / Leoni G., Neumann P.-A., Sumagin R. et al. // *Mucosal Immunol*. – 2015. – Vol. 8. – P. 959–968.

306. Wynn T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases / Wynn T.A. // *J Clin Invest.* –2007– Vol.117 (3). – P. 524–529.
307. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? / Zakhari S. // *Alcohol Res. Health.* – 2006. – Vol. 29(4). – P. 245–54.
308. Zeiser, R. B-cell targeting in chronic graft-versus-host disease / R. Zeiser , S. Sarantopoulos, B.R. Blazar // *Blood.* – 2018. – Vol. 131(13). – P. 1399-1405.
309. Zhang, F. Chronic alcohol consumption inhibits peripheral NK cell development and maturation by decreasing the availability of IL-15 / F. Zhang, A. Little, H. Zhang // *J Leukoc Biol.* – 2017. – Vol. 101(4). – P. 1015–1027.
310. Zhang, H. Chronic alcohol consumption in mice increases the proportion of peripheral memory T cells by homeostatic proliferation. / H. Zhang, G.G. Meadows // *J. Leukoc. Biol.* 2005. –Vol. 78(5). – P. 1070–1080.
311. Zhou, J. Alcohol consumption decreases IL-2-induced NF κ B activity in enriched NK cells from C57BL/6 mice / J. Zhou, G.G. Meadows // *Toxicol Sci.* – 2003. – Vol. 73 (1). – P. 72–79.
312. Zhou, Z. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity / Z. Zhou, M.J. Xu, B. Gao // *Cell Mol Immunol.* – 2016. – Vol. 13(3). – P. 301–315.
313. Zinc supplementation attenuates ethanol- and acetaldehyde-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS) production and by influencing intracellular signaling / Szuster-Ciesielska A., Plewka K., Daniluk J., Kandefers-Szerszeń M. // *Biochem Pharmacol.* – 2009. –Vol. 78 (3). –P. 301–314.