

Иммуноклеточный статус и выраженность эндотоксинемии у больных алкоголизмом с различной степенью алкогольного поражения печени*

ПАНЧЕНКО Л.Ф.
ПИРОЖКОВ С.В.
НАУМОВА Т.А.
ТЕРЕБИЛИНА Н.Н.
БАРОНЕЦ В.Ю.
ФЕДОРОВ И.Г.
ТОТОЛЯН Г.Г.

д.м.н., академик РАН, руководитель лаборатории биохимии ФГУ ННЦ наркологии Росздрава, Москва
д.м.н., профессор, в.н.с. лаборатории биохимии ФГУ ННЦ наркологии Росздрава, Москва
к.б.н., с.н.с. лаборатории биохимии ФГУ ННЦ наркологии Росздрава, Москва
к.м.н., с.н.с. лаборатории биохимии ФГУ ННЦ наркологии Росздрава, Москва
с.н.с. лаборатории биохимии ФГУ ННЦ наркологии Росздрава, Москва
ассистент кафедры госпитальной терапии №2 лечебного факультета ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, Москва
аспирант кафедры госпитальной терапии №2 лечебного факультета ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, Москва

Исследовали особенности иммуноклеточного статуса и его связь с эндотоксинемией у больных алкоголизмом без патологии печени и с патологией печени различной степени тяжести. Анализ проведен с использованием данных от 102 больных алкоголизмом. Наибольшая активность цитолиза гепатоцитов наблюдалась у больных алкогольным гепатитом. В ряду больных с алкогольным стеатогепатозом — гепатитом — циррозом печени прогрессивно нарастала тяжесть холестаза и отношение АСТ/АЛТ (от 0,89 до 1,69). Содержание эндотоксина в плазме крови у больных алкогольным циррозом выше на 30% по сравнению с лицами, страдающими алкогольным стеатозом. Обнаружена достоверная положительная корреляция между содержанием в плазме крови эндотоксина и прямого билирубина. Иммуноклеточный статус больных алкоголизмом без клинически выраженных проявлений алкогольного заболевания печени характеризовался тенденцией к более высокому общему содержанию лейкоцитов, натуральных киллеров, нейтрофилов и моноцитов по сравнению с группой здоровых людей; при этом был дефицит Т-хелперных лимфоцитов. Активация неспецифического воспалительного компонента иммунного ответа сохранялась у больных алкогольным гепатитом, что проявлялось достоверным увеличением популяций эффекторных клеток воспаления — нейтрофилов и моноцитов; в то же время отмечались дефицит Т-хелперов и состояние функциональной супрессии, о чем говорило значительное снижение активности 5'-нуклеотидазы в Т- и В-лимфоцитах. У больных алкогольным циррозом печени признаки активации иммунитета исчезали, сменяясь супрессией всех звеньев иммунитета. Сделан вывод, что у больных алкоголизмом по мере нарастания эндотоксинемии прогрессируют дистрофия печени и гибель гепатоцитов, а умеренная активация неспецифического звена иммунитета на ранних стадиях повреждения печени при развитии цирроза сменяется существенным угнетением всех компонентов системы иммунобиологического надзора — нативного (гранулоцитарно-моноцитарного) и адаптивного (Т- и В-лимфоцитарного).

Введение

Неумеренное употребление алкоголя связано со значительной морбидностью и сопровождается широким спектром соматических осложнений, среди которых наиболее часто возникают фиброз и цирроз печени, алкогольная кардиомиопатия, хронический панкреатит, гастрит, эзофагит, эндокринные нарушения. Алкогольное и токсическое поражения печени приводят к развитию перивенулярного фиброза, который часто переходит в цирроз [15].

В последние годы повысился интерес к эндотоксину кишечного происхождения как важному участнику алкогольного повреждения печени. Повышенная проницаемость кишечника для эндотоксина при хроническом злоупотреблении алкоголем [25] создает условия для активации купферовских клеток, которые, согласно современным представлениям, являются

ключевыми агентами в патогенезе алкогольного гепатита и цирроза. Активированные купферовские клетки выделяют множество различных медиаторов: провоспалительные цитокины, в частности фактор некроза опухоли (ФНО α) и интерлейкин ИЛ-1 β , простагландины, активные формы кислорода (АФК) и т.д. ФНО α и ИЛ-1 β сами обладают прямым цитотоксическим действием и, кроме того, стимулируют миграцию и активацию нейтрофилов, выделяющих в ходе дегрануляции в инфильтрованные ими ткани протеолитические ферменты и АФК [23].

Кроме нарушения проницаемости кишечника, у больных алкоголизмом обнаружена сниженная способность крови связывать эндотоксин за счет уменьшения концентрации в крови таких эндотоксинсвязывающих компонентов, как аполипопротеин, растворимый CD14, липополисахарид (ЛПС)-связывающий

* Работа поддержана грантом РГНФ 07-06-00467а

белок, липопротеины высокой плотности [21]. В эксперименте на мышах уже однократное внутрижелудочное введение этанола резко усиливало гепатотоксичность инъецированного эндотоксина — ЛПС [28], что выражалось в трехкратном повышении уровня сывороточных трансаминаз — биохимических маркеров повреждения печени. Одновременно увеличивалось освобождение купферовскими клетками печени провоспалительного цитокина — ФНО- α .

Нарушения баланса про- и противовоспалительных цитокинов часто отмечают при развитии гепатитов и циррозов. При циррозе печени, например, снижение сывороточных маркеров разрушения коллагена, избыточное осаждение которого считается основной причиной развития цирроза, коррелирует с повышением уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, -6, -8 и ФНО- α) и с уменьшением уровня противовоспалительных цитокинов [13].

Цитокины служат медиаторами межклеточного взаимодействия различных популяций иммунокомпетентных клеток, поэтому при дисбалансе цитокинов можно ожидать нарушения иммуноклеточного статуса и сдвига типов иммунного ответа.

Одним из важнейших участников сигнальных путей, включаемых в иммунных клетках цитокинами, является фермент пуринового обмена — 5'-нуклеотидаза (5'-НТ). Противоспалительные цитокины активируют эктоформу 5'-НТ, образующую в очагах воспаления из экстраклеточного аденозинмонофосфата, источником которого служат дегранулирующиеся нейтрофилы, мощный противовоспалительный медиатор — аденозин. Аденозин ингибирует дегрануляцию нейтрофилов, усиливает барьерную функцию эндотелия и ослабляет системную и тканеспецифические воспалительные реакции [14, 18]. Кроме того, аденозин через аденозиновые рецепторы включает внутриклеточные сигнальные пути, ведущие к блокированию генов, ответственных за синтез провоспалительных цитокинов [16, 12].

На экспериментальной модели эндотоксемии [26] показано, что эндотоксины, в частности ЛПС, вызывают значительные изменения активности 5'-НТ лимфоцитов. В первые 48 ч после индукции эндотоксемии гидролиз нуклеотидов в лимфоцитах повышался, а после 48 ч наблюдалась редукция транскриптов 5'-НТ.

Эктоформа 5'-НТ лимфоцитов известна еще под названием CD73, поверхностного антигена Т- и В-лимфоцитов, служащего маркером поздних стадий активации этих клеток [20]. В зрелых лимфоцитах CD73 положительно коррелирует с пролиферативной реакцией клеток в ответ на антигены или митогены и с выработкой антител В-лимфоцитами. Показано, что В-лимфоциты, положительные по CD73, синтезируют в 8—26 раз больше иммуноглобулинов, чем В-лимфоциты, отрицательные по CD73 [24].

CD73 лимфоцитов опосредует также хемотаксис этих клеток в очаги воспаления, кооперацию Т- и В-лимфоцитов между собой и с антигенпредставляющими клетками [17].

Кроме эктоформы 5'-НТ в лимфоцитах существует и внутриклеточный пул этого фермента. Внутриклеточная 5'-НТ связана главным образом с регуляцией уровня цАМФ, осуществляемой 5'-НТ в комплексе с фосфодиэстеразой [9]. Повышение уровня цАМФ в лимфоцитах сопровождается, как правило, ингибированием их функций и активацией апоптоза. Поэтому повышение активности 5'-НТ, участвующей в разрушении цАМФ, положительно коррелирует с активацией лимфоцитов и отрицательно — с интенсивностью апоптоза.

Врожденный дефект 5'-НТ приводит к частым и тяжело протекающим инфекциям, прекращающимся при нормализации фермента [4]. Оценка активности 5'-НТ лимфоцитов рассматривается как весьма чувствительный показатель терапевтической эффективности при разработке новых методов лечения, в частности при первичном отборе новых иммуномодуляторов [5, 3, 1].

Задачей данной работы было сравнение особенностей иммуноклеточного статуса и величины эндотоксинемии у больных алкоголизмом без патологии печени и с патологией печени различной степени тяжести.

Материалы и методы

Исследования были проведены на 104 больных алкоголизмом. Из них у 72 чел., проходивших лечение в Институте реабилитации Национального научного центра наркологии, не было выявлено клинических признаков алкогольного заболевания печени. Эта группа больных включала в себя 2 подгруппы: 1-я — 38 больных с нормальным уровнем активности сывороточных трансаминаз, 2-я — 34 больных с повышенной активностью ферментов. Третья группа состояла из больных, проходивших лечение в отделении гастроэнтерологии 12 ГКБ г.Москвы — клинической базе кафедры госпитальной терапии №2 лечебного факультета РГМУ (зав.кафедрой — академик РАМН Сторожаков Г.И.): 6 чел. — с алкогольным стеатогепатозом, 6 чел. — с алкогольным гепатитом и 20 чел. — с алкогольным циррозом печени. Диагноз *алкогольная болезнь печени (алкогольный стеатоз, алкогольный гепатит, алкогольный цирроз)* установлен на основании клинико-лабораторных и инструментальных методов исследования.

Образцы венозной крови больных получали с 5%-ным ЭДТА в качестве антикоагулянта (соотношение 1:10). Цельную кровь использовали для подсчета общего количества лейкоцитов и приготовления мазков крови с последующим окрашиванием по Романовскому

для подсчета формулы крови и гистохимических окрашиваний. Из оставшейся цельной крови получали суспензию лейкоцитов путем 20—40-минутного отстаивания крови в пробирках и последующего центрифугирования супернатанта при 700 г в течение 15 мин. Образовавшуюся бляшку лейкоцитов трижды промывали раствором Хенкса и использовали для иммуногистохимического окрашивания на иммунофенотипические маркеры. Супернатант центрифугировали 15 мин при 1500 г для получения плазмы.

Количество лейкоцитов в 1 мкл крови подсчитывали с помощью счетчика форменных элементов крови «Пикоскель». Полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы, эозинофилы и базофилы), моноциты и суммарные лимфоциты подсчитывали при микроскопировании мазков крови, окрашенных по Романовскому.

Имунофенотипические популяции лимфоцитов: CD3 (суммарные Т-лимфоциты), CD19 (В-лимфоциты), CD4 (Т-хелперы или Т-индукторы), CD8 (Т-эффекторы или цитотоксические Т-лимфоциты), CD16 (NK-клетки) подсчитывали при микроскопировании мазков крови, окрашенных иммуноцитохимически [2] с использованием моноклональных антител к перечисленным дифференцировочным антигенам и «вторичных» антител к иммуноглобулинам мыши, ме-

ченных пероксидазой хрена. Моноклональные антитела получены в Научном центре иммунологии РАМН.

По разнице между количеством суммарных Т-лимфоцитов (CD3) и Т-лимфоцитов с метками CD4 и CD8, определяли так называемые DN (double negative)-лимфоциты или проапоптотические Т-лимфоциты, являющиеся, по данным литературы, носителями Fas-лиганда [6, 27]. Fas-лиганд определяет чувствительность клеток к Fas-рецепторному или CD95-апоптозу.

В Т- и В-лимфоцитах периферической крови определяли также гистохимическим методом [22] активность 5'-нуклеотидазы (5'-НТ).

Уровень эндотоксина определяли в сыворотке крови с использованием хромогенного LAL-теста фирмы CAMBREX (США).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Microsoft Excel: описательная статистика, корреляционный анализ, двухвыборочный t-тест для выборок с различными дисперсиями.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 показаны результаты исследования функциональных параметров печени и маркеров ее повреждения в группах больных алкоголизмом с раз-

Таблица 1

Результаты биохимического анализа сыворотки крови у больных алкоголизмом с различной степенью алкогольного повреждения печени (M±m)

Показатели	Ед. изм.	Алкогольный стеатогепатоз	Алкогольный гепатит	Алкогольный цирроз	Норма
АЛТ	Ед/л	66,0±10,0	86,0±21,5	50,0±5,14	0—38
АСТ	Ед/л	58,7±7,0	108,3±36,6	84,4±8,8	0—38
АСТ/АЛТ		0,91±0,24	1,43±0,51	1,84±0,23	1,33±0,42
ГГТП	Ед/л	42,0±7,0	293,0±112,0*	358,6±85,7***	0—37 (ж) 0—50 (м)
ЛДГ (общ.)	Ед/л	—	445±64,8	386,1±31,5	225—450
Щелочная фосфатаза	Ед/л	82,5±3,5	152,2±34,7	201±17,0***	64—306
Амилаза	Ед/л	35,8±3,5	71,6±15,5*	61,4±5,3***	10—220
Билирубин общий	мкМ/л	14,45±3,85	14,9±3,0	89,8±23,0**	0—20,5
Билирубин прямой	мкМ/л	3,1±0,4	4,25±0,87	47,9±14,5***	0—5
Мочевина	мм/л	6,15±0,56	6,0±0,8	7,9±1,6	2,5—8,3
Креатинин	мкМ/л	80,5±5,5	92,2±6,88	91,2±9,0	71—115
Холестерин	мм/л	6,0±1,14	5,61±0,28	4,7±0,32	3,6—5,2
Белок общий	г/л	78,0±2,0	69,8±2,2*	70,7±1,99*	65—85
Альбумин	г/л	49,8±1,1	38,3±2,4	36,2±1,25	33,3—57,1
Протромбин по Квику	%	—	86,4±7,2	53,9±3,3	70—130
Глюкоза	мм/л	5,41±0,11	5,73±0,57	5,39±0,17	3,9—6,1
Эндотоксин	ЕУ/мл	3,98±0,59	5,12±1,11	5,19±0,60	Отсутствует

Примечание. АЛТ — аланинтрансаминаза; АСТ — аспартаттрансаминаза; ГГТП — γ-глутамилтранспептидаза; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; "—" — нет данных; достоверность различий по сравнению с группой больных алкогольным стеатогепатозом: * — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001

ными формами алкогольной гепатопатии. Очевидно, что величина цитолиза достигает пика у больных алкогольным гепатитом и постепенно снижается у больных циррозом печени. Последнее связано как с уменьшением общей массы гепатоцитов, так и с угнетением белок-синтетической функции в сохранившихся клетках. При этом отношение АСТ/АЛТ последовательно возрастает с 0,89 в группе с алкогольным стеатозом до 1,26 в группе с алкогольным гепатитом и достигает 1,69 у больных циррозом печени в соответствии с нарастанием дефицита витамина В6, который характерен для больных алкоголизмом. Витамин В6 необходим для реакции обоих ферментов,

причем АЛТ более чувствительна к его дефициту, чем АСТ [10]. Белок-синтетическая функция печени на основании общего содержания белка плазмы достоверно снижается у больных алкогольным гепатитом и циррозом по сравнению с больными стеатогепатозом. Одновременно можно наблюдать значительное усугубление тяжести холестаза в ряду алкогольный стеатоз — гепатит — цирроз. Об этом говорит нарастание билирубинемии, в том числе увеличение конъюгированной фракции более чем в 10 раз при циррозе по сравнению с другими группами больных, а также резко прогрессирующее увеличение активности ГГТ и щелочной фосфатазы.

Таблица 2

Иммунноклеточный статус больных алкоголизмом без клинических проявлений заболевания печени (M±m)

Иммунологический показатель	Единица измерения	Здоровые люди	Больные алкоголизмом	
			Уровень печеночных трансаминаз	
			АЛТ 25,81±1,43 АСТ 27,9±1,84 ГГТ 30,76±5,04	АЛТ 59,56±6,21 АСТ 64,23±9,11 ГГТ 58,89±14,07
Количество обследованных		17	38	34
Лейкоциты	Тыс./мкл	6,96±0,36	7,38±0,42	7,09±0,42
Лимфоциты суммарные	%	31,86±3,72	31,71±2,24	33,76±2,80
	Тыс./мкл	2,22±0,27	2,40±0,20	2,40±0,24
Т-лимфоциты CD3	%	67,71±2,88	70,58±2,06	74,71±1,99 *
	Тыс./мкл	1,50±0,20	1,71±0,17	1,81±0,19
Т-хелперы CD4	%	44,57±4,06	21,23±1,38 ***	31,69±3,35 ** ##
	Тыс./мкл	1,08±0,16	0,52±0,07 ***	0,70±0,12*
Т-супрессоры/ эффекторы CD8	%	22,86±1,60	18,58±1,16	15,69±2,57**
	Тыс./мкл	0,52±0,07	0,45±0,05	0,44±0,10
ИРИ	Тх/Тс	2,03±0,23	2,28±1,11	2,84±0,81
DN-клетки	%	0,29±3,03	28,78±2,36***	32,23±4,64***
	Тыс./мкл	-0,02±0,04	0,71±0,08***	0,72±0,09
5-нуклеотидаза Т-лимфоцитов	Цитохим. индекс	0,47±0,02	0,68±0,08 **	0,72±0,12***
В-лимфоциты CD19	%	11,71±1,87	11,08±1,00	9,18±1,13
	Тыс./мкл	0,27±0,04	0,25±0,02	0,23±0,05
5'-нуклеотидаза В-лимфоцитов	Цитохим. индекс	0,53±0,02	0,78±0,08 ***	0,79±0,12***
NK-клетки CD16	%	6,29±1,16	8,19±1,31	5,94±1,18
	Тыс./мкл	0,15±0,02	0,20±0,03	0,14±0,03
Нейтрофильные гранулоциты	%	50,43±4,52	58,69±2,64	55,94±3,08
	Тыс./мкл	4,06±0,37	4,57±0,34	4,03±0,38
Индекс сегментации ядер нейтрофилов		0,06±0,01	0,06±0,01	0,04±0,01
Токсогенные нейтрофилы	%	0,83±0,66	3,80±1,59	2,12±1,33
Эозинофилы	%	3,71±0,96	2,87±0,41	2,24±0,60
	Тыс./мкл	0,23±0,05	0,22±0,03	0,15±0,04
Моноциты	%	6,14±0,72	6,58±0,71	8,29±1,01
	Тыс./мкл	0,43±0,06	0,50±0,06	0,58±0,08

Примечание. *(**) — достоверная разница показателя в группе больных по сравнению с аналогичным показателем в группе здоровых лиц, подсчитанная непарным t-тестом (пакет анализа Excel): * — ≤0,05; ** — ≤0,01; *** — ≤0,00; #(#) — достоверная разница показателя между группами больных алкоголизмом с разным уровнем печеночных трансаминаз

Недостаточное выделение желчи в кишечник способствует росту болезнетворной флоры и может усиливать всасывание эндотоксина из кишечника в кровь брыжеечных сосудов. В экспериментах на кроликах, которым перевязывали желчный проток, показано, что холестаза способствует существенному возрастанию частоты эндотоксинемии [19]. Эти данные подтверждаются результатами нашей работы — содержание эндотоксина в плазме крови у больных алкогольным циррозом выше на 30% по сравнению с лицами, страдающими алкогольным стеатозом, в соответствии с наличием тяжелого холестаза в первой подгруппе и отсутствием его во второй (табл. 1). Кроме того, имеется достоверная положительная корреляция между содержанием в плазме крови эндотоксина и прямого билирубина (коэф. Спирмена 0,46; $p=0,037$).

Следует также отметить более высокую активность амилазы в группах больных с алкогольным гепатитом и циррозом по сравнению с алкогольным стеатозом. В эксперименте показано, что алкоголь и эндотоксин потенцируют эффект каждого из этих веществ по отдельности на активность некротических процессов в поджелудочной железе [7].

Иммунноклеточный статус больных алкоголизмом без клинически выраженных проявлений алкогольного заболевания печени характеризовался тенденцией к более высокому общему содержанию лейкоцитов, а также натуральных киллеров, нейтрофилов и моноцитов (табл. 2) по сравнению с группой здоровых людей. Кроме того, выявлена статистически достоверная активация 5'-нуклеотидазы в Т- и В-лимфоцитах.

Таблица 3

Иммунноклеточный статус больных алкогольным гепатитом и алкогольным циррозом печени (M±m)

Иммунологический показатель	Ед-ца измерения	Здоровые	Больные АГ	Больные АЦП
Количество обследованных		17	8	21
Лейкоциты	Тыс./мкл	6,96±0,36	8,49±0,87	5,38±0,58 ## ^^
Лимфоциты суммарные	%	31,86±3,72	24,38±4,56	29,90±3,06
	Тыс./мкл	2,22±0,27	2,09±0,47	1,40±0,12 * ###
Т-лимфоциты CD3	%	67,71±2,88	70,5±4,22	78,33±1,68 ***
	Тыс./мкл	1,50±0,20	1,52±0,4	1,09±0,10 * ###
Т-хелперы CD4	%	44,57±4,06	31,81±4,44 * ##	41,57±1,66 ### ^
	Тыс./мкл	1,08±0,16	0,54±0,18**	0,57±0,05 ***
Т-супрессоры/ эффекторы CD8	%	22,86±1,60	29,00±3,82 ##	32,57±2,02 *** ###
	Тыс./мкл	0,52±0,07	0,55±0,22	0,44±0,04
ИРИ	Тх/Тс	2,03±0,23	1,13±0,14 ***	1,36±0,08 **
DN-клетки	%	0,29±3,03	9,67±5,67 ###	4,19±2,80 ###
	Тыс./мкл	-0,02±0,04	0,18±0,09 * ###	0,07±0,04 ##
5-нуклеотидаза Т-лимфоцитов	Цитохим. индекс	0,47±0,02	0,24±0,03 *** ###	0,31±0,04 *** ###
В-лимфоциты CD19	%	11,71±1,87	9,87±2,23	5,52±0,74 *** ### ^
	Тыс./мкл	0,27±0,04	0,18±0,04	0,07±0,01 *** ### ^^
5'-нуклеотидаза В-лимфоцитов	Цитохим. индекс	0,53±0,02	0,20±0,06 *** ###	0,34±0,1 * ###
NK-клетки CD16	%	6,29±1,16	7,25±1,19	6,52±1,26
	Тыс./мкл	0,15±0,02	0,15±0,04	0,10±0,02 * ##
Нейтрофильные гранулоциты	%	50,43±4,52	62,87±3,78	57,09±3,08
	Тыс./мкл	4,06±0,37	5,33±0,51 *	3,31±0,51 # ^^
Индекс незрелости нейтрофилов		0,06±0,01	0,05±0,01	0,12±0,02 ** ## ^^
Токсогенные нейтрофилы	%	0,83±0,66	14,39±5,7 **	34,14±0,47 *** ### ^^
Эозинофилы	%	3,71±0,96	1,25±0,35 ** ##	2,00±0,4
	Тыс./мкл	0,23±0,05	0,10±0,02 * #	0,10±0,01 ** #
Моноциты	%	6,14±0,72	11,50±1,73 *** ##	10,6±1,18 *** ##
	Тыс./мкл	0,43±0,06	0,97±0,14 *** ###	0,55±0,08 ^^

Примечание. * (**), # (**), ^ (^) — достоверная разница показателя в группе больных по сравнению с аналогичным показателем в группе здоровых лиц, подсчитанная непарным t-тестом (пакет анализа Excel); # (**), ^ (^) — достоверная разница показателя у больных алкогольным гепатитом или циррозом по сравнению с больными алкоголизмом без клинически выраженной патологии печени; ^ (^) — достоверная разница показателя у больных алкогольным циррозом по сравнению с больными алкогольным гепатитом

Выявленная нами картина иммунных сдвигов соответствует факту повышения уровня эндотоксинов у больных алкоголизмом с повреждением печени, поскольку из литературы известно [26], что эндотоксемия сначала вызывает повышение активности 5'-нуклеотидазы, сменяющееся затем ингибированием генов 5'-нуклеотидазы провоспалительными цитокинами. Преимущественно неспецифический воспалительный тип активации иммунитета у больных алкоголизмом без выраженных клинических признаков заболевания печени подтверждается и достоверным дефицитом у больных Т-хелперов (табл. 2), ключевых клеток специфического иммунного ответа, на фоне заметного повышения клеток — эффекторов воспаления — нейтрофилов и моноцитов, а также повышения доли нейтрофилов с так называемой токсогенной зернистостью. Полученные нами данные об умеренном повышении активности неспецифического звена иммунитета у больных алкоголизмом без явных признаков повреждения печени соответствуют результатам исследования, в котором злоупотребление алкоголем сопровождалось существенным повышением концентрации в плазме ЛПС-связывающего белка и растворимой формы рецептора CD14, к которому присоединяется комплекс ЛПС/ЛПС-связывающий белок [8]. В то же время, в цитируемой работе установили факт некоторого ослабления специфического звена иммунитета, так как в крови больных алкоголизмом были снижены титры анти-ЛПС IgG.

Активация неспецифического воспалительного компонента иммунного ответа сохраняется и даже усиливается у больных алкогольным гепатитом (табл. 3). Это проявляется статистически достоверным по сравнению со здоровыми лицами увеличением популяций эффекторных клеток воспаления: общего количества нейтрофилов, процента нейтрофилов с токсогенной зернистостью и моноцитов-макрофагов. Лимфоцитарное же звено иммунитета характеризуется количественным дефицитом в отношении Т-хелперов и функциональной супрессией, о чем свидетельствует достоверное и резкое (в 2 раза по сравнению с группой здоровых лиц и почти в 3 раза по сравнению с группами больных алкоголизмом без клинических признаков алкогольного заболевания печени) снижение активности 5'-нуклеотидазы как в Т-, так и в В-лимфоцитах.

У больных алкогольным циррозом печени все признаки активации иммунитета исчезают, сменяясь супрессией всех звеньев иммунитета (табл. 3). Отмечается достоверный дефицит суммарных лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-эффекторов, В-лимфоцитов и натуральных киллеров и даже клеток-эффекторов воспалительной реакции (нейтрофилов), стимулированных в трех других группах больных ал-

коголизмом. Достоверно повышается индекс незрелости нейтрофилов, свидетельствуя о напряженности костномозгового миелопоэза и ускоренном выходе в циркуляцию недостаточно зрелых и функционально неполноценных клеток. Возрастает более чем в 2 раза по сравнению с больными алкогольным гепатитом процент нейтрофилов с токсогенной зернистостью. Количество моноцитов-макрофагов, повышенное у больных алкогольным гепатитом, у больных циррозом возвращается к норме.

Таким образом, нами установлено, что у больных алкоголизмом по мере нарастания степени эндотоксемии прогрессируют дистрофия печени и гибель гепатоцитов, а умеренная активация неспецифического звена иммунитета на ранних стадиях повреждения печени при развитии цирроза сменяется существенным угнетением всех компонентов системы иммунобиологического надзора — нативного (гранулоцитарно-моноцитарного) и адаптивного (Т- и В-лимфоцитарного).

Список литературы

1. Батурина И.Г. Влияние препарата Кодивак на показатели неспецифической резистентности животных: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.б.н. — М., 2000.
2. Bourne J.A. Handbook of immunoperoxidase staining methods // Dakopatts. — 1983. — 37 p.
3. Burnstock G., Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential // JPET. — 2000. — Vol. 295, №3. — P. 862—869.
4. Christensen L.D. CD73 (ecto-5'-nucleotidase) on blood mononuclear cells. Regulation of ecto-5'-nucleotidase activity and antigenic heterogeneity of CD73 on blood mononuclear cells from healthy donors and from patients with immunodeficiency // APMIS Suppl. — 1997. — Vol. 73. — P. 1—28.
5. Christensen L.D., Andersen V., Nygaard P., Bendtzen K. Effects of immunomodulators on ecto-5'-nucleotidase activity on blood mononuclear cells *in vitro* // Scand. J. Immunol. — 1992. — Vol. 35. — P. 407.
6. Chu J., Ramos P., Rosendorff A. et al. Massive up-regulation of the Fas ligand in lpr and gld mice: implications Fas regulation and the graft-versus-host disease-like wasting syndrome // J. Exp. Med. — 1995. — Vol. 181. — P. 393.
7. Fortunato F., Deng X., Gates L.K. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis? // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2006. — Vol. 290. — P. G232—G241.
8. Frank J., Witte K., Schrod W., Schutt Ch. Chronic alcoholism causes deleterious conditioning of innate immunity // Alcohol & Alcoholism. — 2004. — Vol. 39, №5. — P. 386—392.
9. Galoyan A.A., Gurvitz B.Ya., Sharova N.P. Cyclic nucleotide phosphodiesterase and 5'-nucleotidase: a coupled system // Neurochem. Res. — 1989. — Vol. 14, №12. — P. 1213—1221.
10. Giannini E.G., Testa R., Savarino V. Liver enzyme alterations: a guide for clinicians // CMAJ. — 2005. — Vol. 172, №3. — P. 367—392.
11. Kalsi K., Lawson CH., Dominguez M. et al. Regulation of ecto-5 nucleotidase by TNF- α in human endothelial cells // Mol. Cell. Biochem. — 2002. — Vol. 232. — P. 113—119.
12. Kobie J.J., Shah P.R., Yang L., Rabhahn J.A., Fowell D.J., Mosmann T.R. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine // J. Immunol. — 2006. — Vol. 177, №10. — P. 6780—6786.

13. Koivisto H., Hietala J., Niemela O. An inverse relationship between markers of fibrogenesis and collagen degradation in patients with or without alcoholic liver disease // *Am. J. Gastroenterol.* — 2007. — Vol. 102, №4. — P. 773—779.
14. Lennon P.F., Taylor C.T., Stahi G.L., Colgan S.P. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A_{2B} receptor activation // *J. Exp. Med.* — 1998. — Vol. 188. — P. 1433.
15. Lieber C.S. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases // *The Mount Sinai Journal of Medicine.* — 2000. — Vol. 67, №1. — P. 84—94.
16. Link A.A., Kino T., Worth J.A., McGuire J.L., Crane M.L., Chrousos G.P., Wilder R.L., Elenhov I.J. Ligand-activation of the A_{2a} receptors inhibits IL-12 by human monocytes // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164, №1. — P. 436—442.
17. Niemela J., Henttinen T., Yegutkin G.G., Airas L., Kuajari A.-M., Rajala P., Jalkanen S. IFN- α induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5' nucleotidase) up-regulation // *J. Immunology.* — 2004. — Vol. 172. — P. 1646—1653.
18. Ohta A., Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in down-regulation of inflammation and protection from tissue damage // *Nature.* — 2001. — Vol. 414. — P. 916.
19. Papacostas C., Bezirtoglou E., Pitiakoudis M. et al. Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice // *Clin. Exp. Med.* — 2003. — Vol. 3, №2. — P. 124—128.
20. Peola S., Borrione P., Matera L., Malavasi F., Pileri A., Massaia M. Selective induction of CD 73 expression in human lymphocytes by CD38 ligation: a novel pathway linking signal transducers with ecto-enzyme activities // *J. Immunol.* — 1996. — Vol. 157, №10. — P. 4354—4362.
21. Schafer C., Parlesak A., Schutt C., Bode J.C., Bode C. Concentrations of lipopolysaccharide-binding protein, bactericidal/permeability-increasing protein, soluble CD14 and plasma lipids in relation to endotoxemia in patients with alcoholic liver disease // *Alcohol Alcohol.* — 2002. — Vol. 37, №1. — P. 81—86.
22. Silber R., Conklyn M., Grusky G., Zucker-Franklin D. Human lymphocytes: 5'-nucleotidase-positive and -negative // *J. Clin. Invest.* — 1975. — Vol. 56, №5. — P. 1324—1327.
23. Thiele D.L. Tumor necrosis factor, the acute phase response and the pathogenesis of alcoholic liver disease // *Hepatology.* — 1989. — Vol. 9. — P. 497—499.
24. Thompson L.F., Ruedi J.M. Synthesis of immunoglobulin G by pokeweed mitogen-Epstein-Barr virus-stimulated human B cells *in vitro* is restricted to the ecto-5'-nucleotidase positive subset // *J. Clin. Invest.* — 1988. — Vol. 82, №3. — P. 902—905.
25. Thurman R.G. Mechanisms of hepatic toxicity II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin // *Am. J. Physiol.* — 1998. — Vol. 275. — P. G605—G611.
26. Vuaden F.C., de Paula Cognato G., Bonorino C., Bogo M.R., de Freitas Sarkis J.J., Bonan C.D. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats // *Life Sci.* — 2007. — Vol. 80, №19. — P. 1784—1791.
27. Xiao S., Zhang X., Mann K.K. et al. Changes in sensitivity of peripheral lymphocytes of autoimmune gld mice to FasL-mediated apoptosis reveal a mechanism for the preferential deletion of CD4-CD8-B220+ cells // *Int. Immunol.* — 2004. — Vol. 16, №5. — P. 759—766.
28. Yamashina S., Ikejima K., Enomoto N., Takei Y., Sato N. Ethanol changes sensitivity of Kupffer cells to endotoxin // *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.* — 2003. — Vol. 38, №5. — P. 415—424.

IMMUNE STATUS AND THE EXTENT ENDOTOXINEMIA IN ALCOHOL-DEPENDENT PATIENTS WITH VARIOUS DEGREE OF ALCOHOL-INDUCED LIVER INJURY

PANCHENKO L.F.	Dr.med.sci., Professor, Academician RAMS, Head of laboratory of biochemistry of National Research Center for Addictions, Moscow
PIROZHKOVA S.V.	Dr.med.sci., Professor, Leading Researcher of laboratory of biochemistry of National Research Center for Addictions, Moscow
NAUMOVA T.A.	Cand. Biol. Sci., Senior Researcher of laboratory of biochemistry of National Research Center for Addictions, Moscow
TEREBILINA N.N.	Cand.med.sci., Senior Researcher of laboratory of biochemistry of National Research Center for Addictions, Moscow
BARONETZ V.Yu.	Senior Researcher of laboratory of biochemistry of National Research Center for Addictions, Moscow
FIODOROV L.G.	Assistant of Department of hospital therapy of Russian State Medical University
TOTOLYAN G.G.	Post-graduate student of Russian State Medical University

The immune status and its relationship with the extent of endotoxemia were studied in a group of 102 alcohol addicts with and without alcohol-induced liver pathology. The highest rate of hepatocytes destruction was observed in patients with alcoholic hepatitis. In a series of consecutive conditions — alcoholic steatohepatitis-hepatitis-liver cirrhosis the severity of cholestasis and values of the AST/ALT ratio were progressively increased. The content of plasma endotoxin is by 30% higher in patients with liver cirrhosis than in those with alcoholic steatosis. There was a significant positive correlation between the concentrations of plasma endotoxin and levels of conjugated bilirubin. The immune status of the alcohol addicts without liver disease was characterized by a tendency of higher content of total leukocytes, NK cells, neutrophils and monocytes compared with the healthy individuals, and by a deficit of CD4+ T-cells. Moderate activation of the non-specific immunity persisted in patients with alcoholic hepatitis demonstrated by a significant increase in neutrophils and monocytes with a simultaneous loss of CD4+ T-cells. The immune deficiency state was also confirmed by a prominent decrease in 5'-nucleotidase activity in T- and B-lymphocytes. In patients with alcoholic cirrhosis signs of slightly activated immunity were replaced by signs of suppression of all aspects of the host defense. A conclusion was made that in alcohol addicts aggravation of endotoxemia is accompanied by an increase in severity of liver damage, and moderate activation of the nonspecific defense factors at the early stages of liver injury is replaced by a significant impairment of immunity in cirrhosis including both aspects — native and adaptive.