

ОЦЕНКА КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛЬНЫМ ФИБРОЗОМ ПЕЧЕНИ

© 2018 г. Н. Д. Газатова¹, К. А. Юрова¹, Д. В. Гаврилов², К. И. Такунова¹,
А. П. Болотов¹, Д. А. Скуратовская¹, Л. С. Литвинова^{1*}

*E-mail: larisalityvinova@yandex.ru

¹ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,
Калининград, Россия;

²ГБУЗ «Наркологический диспансер Калининградской области», Калининград, Россия

Поступила: 15.01.2018. Принята: 28.08.2018

Изучали содержание молекул внеклеточного матрикса (ВКМ) в сыворотке крови больных алкогольным фиброзом печени (АФП), ранжированных в зависимости от стадии фибротического процесса. Обследовано 58 больных АФП (АФП, МКБ 10-K70.2) и 20 условно здоровых доноров. Оценка уровня молекул внеклеточного матрикса (тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы-1, коллагена IV типа, гиалуроновой кислоты и N-терминального пептида проколлагена III типа) в сыворотке крови проводили с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвич» метода (ELISA). Установлено, что хроническое потребление этанола приводит к достоверному повышению в крови уровня (в сравнении с контролем) всех исследуемых молекул ВКМ. Содержание в сыворотке крови тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы-1, коллагена IV типа и гиалуроновой кислоты (но не N-терминального пептида проколлагена III типа) у больных АФП четко коррелирует со стадией фиброза. Исследуемые нами молекулы ВКМ могут быть потенциальными кандидатами для определения стадии фиброза у больных АФП.

Ключевые слова: алкогольный фиброз печени, гиалуроновая кислота, коллаген, N-терминальный пептид проколлагена III типа, TIMP-1

DOI: 10.31857/S102872210002375-7

Адрес: 236001, Калининградская область, г. Калининград, ул. Гайдара, д. 6, каб. 302. ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, Литвинова Лариса Сергеевна.

Тел.: +7 (911) 482-04-89, +7 (4012) 595-595, доб. 6631.

E-mail: larisalityvinova@yandex.ru

Авторы:

Газатова Н. Д., научный сотрудник Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия;

Юрова К. А., к.м.н., научный сотрудник Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия;

Гаврилов Д. В., заведующий наркологическим отделением, врач-психиатр нарколог Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Наркологический диспансер Калининградской области», Калининград, Россия;

Такунова К. И., студент Института Живых Систем, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия;

Болотов А. П., м.н.с. Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия;

Скуратовская Д. А., биолог Базовой лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия;

Литвинова Л. С., д.м.н., заведующая Базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Хронические заболевания печени, опосредованные систематическим потреблением алкоголя, составляют до 50% всех случаев цирроза печени и являются одной из острых проблем медико-социальных проблем, занимая лидирующие позиции среди причин смертности населения [1]. Фиброз печени, формирующийся вследствие воз-

действия гепатотоксических агентов, в том числе этанола, является результатом повторяющегося во времени процесса повреждения-восстановления клеток печеночной паренхимы — гепатоцитов и характеризуется чрезмерным накоплением компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в результате молекулярной и гистологической перегруппировки коллагенов, гликопротеинов и гиалуронатов [2, 3]. Как следствие, все вышеперечисленные процессы приводят к изменению структуры и функций органа [3].

Механизмы этанол-индуцированного фиброгенеза на сегодняшний день до конца не расшифрованы. Установлено, что формирование цирроза при алкогольной болезни печени (АБП) может происходить путем прогрессирования фиброза, в отсутствие выраженного воспаления [4]. В то же время, активация клеточных и гуморальных компонентов иммунитета при АБП является важным звеном фиброгенеза, опосредуя трансформацию покоящихся (в пространстве Диссе) звездчатых клеток печени (ЗКП) в пролиферирующие фибробластоидные клетки, продуцирующие компоненты ВКМ [5]. Кроме того, этанол опосредует активацию ЗКП печени путем увеличения количества эндотоксинов, вырабатываемых кишечником, гипоксии (окислительного стресса) или образования токсических и профиброгенных метаболитов (например, ацетальдегида или пероксидов липидов) [6]. Накопление компонентов ВКМ, как уже упоминалось ранее, приводит к закрытию функциональных межклеточных пространств, нарушая процессы обмена между гепатоцитами и синусоидами, способствуя развитию гипоксии ткани печени с вовлечением гепатоцитов в процесс фиброгенеза [7].

Классическим способом определения стадии фиброза печени является биопсия печени с гистологической оценкой полученного материала; однако этот инвазивный метод имеет ряд серьезных ограничений и недостатков [8]. 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 [8]. В связи с вышесказанным, **целью** нашего исследования явилось количественное определение содержания молекул ВКМ (тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы-1 (TIMP-1), коллагена IV типа, гиалуроно-

вой кислоты (ГК) и N-терминального пептида проколлагена III типа (P-III-NP)), участвующих в развитии фиброза печени с выявлением их диагностической ценности, в сыворотке крови у больных алкогольным фиброзом печени, в зависимости от стадии процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось согласно протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. и Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете БФУ им. И. Канта (г. Калининград).

Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая из локтевой вены утром натощак с помощью стандартных вакуумных систем BD VACUTAINERTM («Greiner-bio-one», Австрия) с гепарином (20 Ед/мл) у 58 больных алкогольным фиброзом печени (АФП, МКБ 10-K70.2) (28 женщин и 30 мужчин в возрасте $46,4 \pm 5,6$ лет) и 20 условно здоровых доноров (10 женщин и 10 мужчин в возрасте $38,3 \pm 6,4$ лет).

По данным шкалы METAVIR, основываясь на результатах фиброэластометрии (Fibroscan, Echosens, Франция), пациенты были разделены на 4 группы, в зависимости от стадии фибротического процесса (**таблица 1**). Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялись заведующим наркологическим отделением, врачом психиатром-наркологом Гавриловым Д. В., на базе ГБУЗ «Наркологический диспансер Калининградской области» (гл. врач — Скалин Ю. Н.), а также заведующим диагностическим отделением, врачом ультразвуковой диагностики высшей квалификационной категории, Котовым Н. Б., на базе клинко-диагностического центра ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта» (гл. врач — Иванова О. В.).

Количественную оценку сывороточного содержания молекул ВКМ (TIMP-1, коллагена IV типа, ГК и P-III-NP) проводилось с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвич»

Таблица 1. Оценка стадий фиброза у больных алкогольным фиброзом печени по шкале METAVIR (1996 г.)

I стадия n=15	легкий фиброз	1–4 балла
II стадия n=16	умеренный фиброз	5–8 баллов
III стадия n=15	тяжелый фиброз	9–12 баллов
IV стадия n=12	цирроз	13–16 баллов

метода (ELISA), с использованием специальных наборов реагентов: «HA Test Kit» (Corgenix, Inc.), «Serum Collagen IV EIA» (Biotrin), «Biosource Human TIMP-1 ELISA» (Invitrogen Corporation); «P-III-P» (Labguality) (Финляндия).

Анализ полученных данных осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). При анализе выборок на нормальность распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. В случае отклонения массива данных от нормального закона распределения рассчитывали медиану (М) и квартили (Q1-Q3). Сравнительный анализ между группами проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Статистически значимых гендерных различий обнаружено не было. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (пу-

тем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии – r^2) анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящее время активно разрабатываются методики мало- и неинвазивного определения фиброза печени (и его стадий) с помощью оценки молекул внутриклеточного матрикса, непосредственно участвующих в развитии фиброза [8].

Уровень TIMP-1 в сыворотке крови условно здоровых доноров был равным 256,40 (236,42–263,49) нг/мл. Его значения были сопоставимы с аналогичными параметрами пациентов

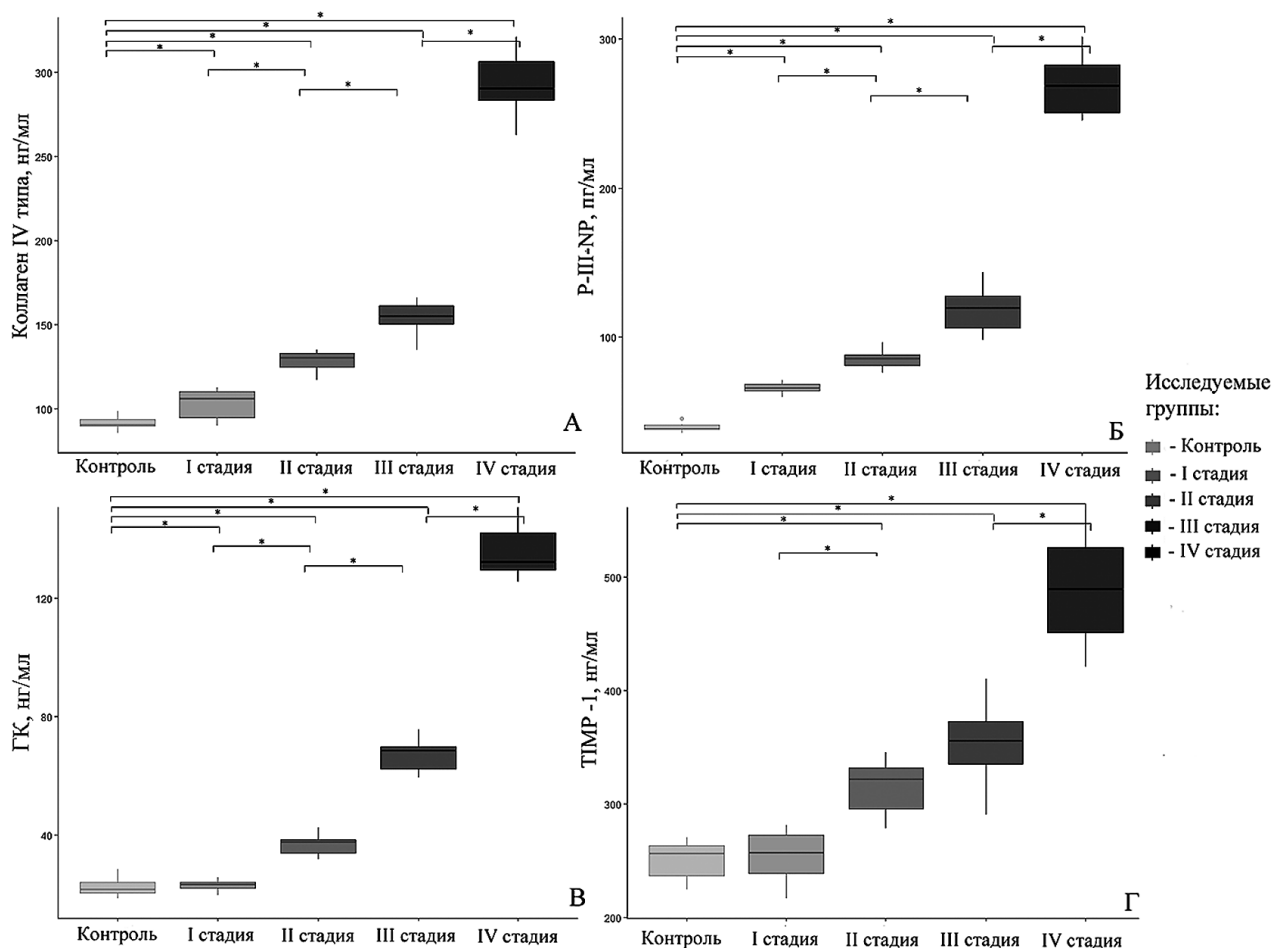


Рис. Содержание молекул внутриклеточного матрикса в сыворотке крови у больных алкогольным фиброзом печени в зависимости от стадии процесса.

А – сывороточный уровень коллагена IV типа; Б – N-терминального пептида проколлагена III типа (P-III-NP); В – гиалуроновой кислоты (ГК); Г – металлопротеиназы-1 (TIMP-1).

с АФП с I-ой стадией. Достоверное увеличение (в сравнении с контролем) 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 (рис.).

Содержание коллагена IV типа в сыворотке крови условно здоровых доноров составило 90,37 (89,79–93,76) нг/мл. Достоверный рост исследуемого показателя (в сравнении с контролем) регистрировался у всех пациентов с АФП, также достигая максимума у больных АФП с IV стадией ($p < 0,05$) (рис.).

У условно здоровых доноров содержание гиалуроновой кислоты в сыворотке крови составило 21,43 (20,28–23,89) нг/мл. Уровень исследуемого анализа достоверно возрастал (в сравнении с контролем) уже при I-ой стадии фиброза печени. Наиболее высокие значения исследуемого показателя регистрировались при IV стадии фиброза ($p < 0,05$) (рис.).

По результатам проведенного исследования, уровень Р-III-NP в сыворотке крови здоровых доноров был равен 38,43 (38,26–40,82) пг/мл. У больных алкогольным фиброзом печени данный показатель достоверно возрастал, также достигая максимальных значений на IV стадии фиброзного процесса ($p < 0,05$) (рис.).

Согласно результатам проведенного нами регрессионного анализа, содержание ТИМР-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 Р-III-NP и стадиями фиброза у обследованных лиц с хроническим потреблением алкоголя установлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже упоминалось ранее, 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) [3]. Активность MMPs четко регулируется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMPs), в том числе ТИМР-1 [9, 10]. Полученные нами закономерности относительно содержания ТИМР-1 в кро-

ви больных АФП, находят отражение в исследованиях зарубежных авторов. Так, Campbell S. и соавт. (2001) установили сильные взаимосвязи сывороточных уровней ТИМР-1 со стадиями фиброза, выявленными при проведении биопсии печени у пациентов с алкогольной зависимостью [10], что позволяет относить ТИМР-1 к критическим детерминантам развития фиброза. Доказано, что процесс регрессии фиброза ассоциирован со снижением уровня ТИМР-1 в крови, вследствие апоптотической гибели активированных ЗКП [3, 7, 9, 11].

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 [9].

Установлено, что концентрация ТИМР-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 [8]. Вышесказанное подтверждается выявленной нами общей сильной позитивной корреляцией между содержанием коллагена IV типа и ТИМР-1 в сыворотке крови больных АФП ($r = 0,98$, $p < 0,01$). Кроме того, содержание ТИМР-1 и коллагена IV типа у больных алкогольным фиброзом печени было четко ассоциировано со стадией фибротического процесса. Следует отметить, что в настоящее время определение коллагена IV в крови широко используется как параметр оценки антивирусной терапии при заболеваниях печени вирусной этиологии [12].

В свою очередь, ГК является главным компонентом ВКМ [7]. Обнаруженное нами повышение (в сравнении с контролем) уровня ГК в сыворотке крови больных алкогольным фиброзом печени, демонстрировало четкую зависимость от стадии фибротического процесса, что также согласуется с данными научной периодики. 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 [7]. 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 [9]. Кро-

ме 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 [13]. Таким образом, выявленная нами динамика концентрации ГК в сыворотке крови больных АФП, ассоциированная со стадией фиброза, может быть связана с повреждениями синусоидальных эндотелиальных клеток и нарушениями микроциркуляторного русла печени, развивающимися в результате хронического потребления алкоголя.

Следующий анализ, P-III-NP, метаболизируется синусоидальными клетками и отражает процесс синтеза коллагена в печени [14]. Полученные нами результаты, 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 [10]. Согласно данным литературы, высокие показатели уровня P-III-NP в крови при дегенеративных заболеваниях печени следует расценивать как прогностически неблагоприятные [15].

Таким образом, результаты нашей работы продемонстрировали, что 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. 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Miller A. M., Horiguchi N., Jeong W. I., Radaeva S., Gao B. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011, 35 (5), 787–793.
2. Higuchi H., Gores G. J. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med*. 2003, 3 (6), 483–490.
3. Li D., Li W., Chen Y., Liu L., Ma D., Wang H., Zhang L., Zhao S., Peng Q. Anti-fibrotic role and mechanism of *Periplaneta americana* extracts in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai) 2018, 50 (5), 491–498.
4. Wan J., Benkdane M., Teixeira-Clerc F., Bonnafous S., Louvet A., Lafdil F., Pecker F., Tran A., Gual P., Mallat A., Lotersztajn S., Pavoinev C. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014, 59 (1), 130–142.
5. Szuster-Ciesielska A., Plewka K., Daniluk J., Kandefer-Szerszeń M. Zinc supplementation attenuates ethanol- and acetaldehyde-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS) production and by influencing intracellular signaling. *Biochem Pharmacol*. 2009, 78 (3), 301–314.
6. Jeong W. I., Park O., Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008, 134 (1), 248–258.
7. Lieber C. S., Weiss D. G., Paronetto F. Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008, 32 (6), 1031–1039.
8. Lykiardopoulos B., Hagström H., Fredrikson M., Ignatova S., Stål P., Hulcrantz R., Ekstedt M., Kechagias S. 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. *PLoS One*, 2016, 11 (12), e0167776.
9. Li J., Niu J. Z., Wang J. F., Li Y., Tao X. H. Pathological mechanisms of alcohol-induced hepatic portal hypertension in early stage fibrosis rat model. *World J Gastroenterol*. 2005, 11 (41), 6483–6488.
10. Campbell S., Timms P. M., Maxwell P. R., Doherty E. M., Rahman M. Z., Lean M. E., Danesh B. J. Effect of alcohol withdrawal on liver transaminase levels and markers of liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001, 16 (11), 1254–1259.
11. Friedman S. L., Bansal M. B. Reversal of hepatic fibrosis — fact or fantasy? *Hepatology* 2006, 43 (2 Suppl 1), S82–88.
12. Suda T., Okawa O., Masaoka R., Gytoku Y., Tokutomi N., Katayama Y., Tamano M. Shear wave elastography in hepatitis C patients before and after antiviral therapy. *World J Hepatol*. 2017, 9 (1), 64–68.
13. Gudowska M., Cylwik B., Chrostek L. The role of serum hyaluronic acid determination in the diagnosis of liver fibrosis. *Acta Biochim Pol*. 2017, 64 (3), 451–457.
14. Nøjgaard C., Johansen J. S., Christensen E., Skovgaard L. T., Price P. A., Becker U. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2003, 39 (2), 179–186.
15. Trocme C., Leroy V., Sturm N., Hilleret M. N., Bottari S., Morel F., Zarski J. P. 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. *J Viral Hepat*. 2006, 13 (10), 643–651.

EVALUATION OF COMPONENTS OF EXTRACELLULAR MATRIX IN THE BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH ALCOHOLIC FIBROSIS OF THE LIVER

© 2018 N. D. Gazatova¹, K. A. Yurova¹, D. V. Gavrilov², K. I. Takunova¹,
A. P. Bolotov¹, D. A. Skuratovskaia¹, L. S. Litvinova^{1*}

*E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

¹Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

²Narcological Dispensary of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russia

Received: 15.01.2018. Accepted: 28.08.2018

The content of extracellular matrix molecules (EMM) was studied in blood serum in patients with alcoholic liver fibrosis (ALF), ranked depending on the stage of the fibrotic process. 58 patients with AFP (AFP, МКБ 10-K70.2) and 20 conditionally healthy donors were examined. The level of extracellular matrix molecules (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, type IV collagen, hyaluronic acid and type III N-terminal peptide of procollagen III) was evaluated in serum using an enzyme-linked immunosorbent “sandwich” method (ELISA). Chronic consumption of ethanol led to an increase in the level (in comparison with the control) of all the studied molecules of EMM in the blood. The serum content of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, type IV collagen and hyaluronic acid (but not the N-terminal peptide procollagen III type) clearly correlates with the fibrosis stage in ALF patients. EMM molecules can be potential candidates for determining the stage of fibrosis in ALF patients.

Key words: alcoholic liver fibrosis, hyaluronic acid, collagen, type III procollagen N-terminal peptide, TIMP-1

Authors:

Gizatova N. D., Researcher of the Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

Yurova K. A., Ph.D., Researcher of the Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

Gavrilov D. V., head of the narcological department, psychiatrist, narcologist of the State Budgetary Health Care Institution “Narcological Dispensary of the Kaliningrad Region”, Kaliningrad, Russia;

Takunova K. I., student of the Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

Bolotov A. P., Junior Researcher, Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

Skuratovskaia D. A., biologist of the Basic Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

Litvinova L. S., ✉ MD, PhD, Head of the Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies of the Federal State Unitary Enterprise “Baltic Federal University named after I. Kant”, Kaliningrad, Russia;

236001, Russia, Kaliningrad, ul. Gaidara, 6, off. 302. Phone: +7 (911) 482–04–89, +7 (4012) 595–595, (6631).

E-mail: larisalitvinova@yandex.ru.