

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРОВ ФИБРОГЕНЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С 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 им. Иммануила Канта», Калининград, Россия;

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

Методом иммуноферментного анализа проведена оценка содержания про- и противовоспалительных цитокинов у 58 пациентов с алкогольным фиброзом печени (АФП), ранжированных по стадии фиброза. У больных АФП, злоупотребляющих алкоголем, установлена прямая зависимость сывороточного содержания провоспалительных молекул (IL-8 и TNF α , но не IL-6) от стадии фиброза. Повышение уровня противовоспалительных факторов – IL-10 и TGF- β 1 у данной категории пациентов на терминальных стадиях фиброзного процесса может быть компенсаторным механизмом, направленным на подавление избыточного системного воспаления, вследствие воздействия этанола.

Ключевые слова: алкогольная болезнь печени, про- и противовоспалительные цитокины

DOI: 10.31857/S102872210002621-8

Адрес: 236001, 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., н. с. 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. Фиброз печени – тяжелое, прогрессирующее заболевание с высоким уровнем летальных исходов, сопровождается изменением

структуры и функций паренхимы органа, вследствие избыточного воздействия гепатотоксических факторов, в том числе алкоголя [1]. В целом, патогенез алкогольной болезни печени (АБП) связан с действием этанола на процессы фиброгенеза через механизмы врожденного и адаптивного иммунитета [2]. В частности, стимуляция клеток неспецифической резистентности печени (клетки Купфера, резидентные макрофаги), в ответ на изменение структурных компонентов экстрацеллюлярного матрикса (ЭКМ) токсическими метаболитами этанола (в т.ч. ацетальдегидом), приводит к высвобождению активных форм кислорода (АФК) и целого спектра факторов с провоспалительным действием [3]. Выявлены четкие корреляции сывороточных/плазменных уровней провоспалительных молекул (в частности, TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-3 α и др.) с тяжестью острых и хронических заболеваний печени у человека и экспериментальных животных [3]. В то же время следует отметить, что данные о роли цитокинов в повреждении печени, поддержании активности воспалительного процесса и регенерации измененной паренхимы органа, весьма немногочисленны.

В связи с вышесказанным, целью исследования явилось определение содержания про- и противовоспалительных молекул в сыворотке крови пациентов с алкогольным фиброзом печени (АФП), ранжированных по 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 VACUTAINER™ («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 ± 5.6 лет), ранжированных по стадиям фиброза и 20 условно здоровых доноров (10 женщин и 10 мужчин в возрасте 38.3 ± 6.4 лет). Пациенты с АФП, вошедшие в исследование, имели в анамнезе хроническое злоупотребление алкоголя и характеризовались как сильнопьющие (4200–5600 гр 100% этанола в месяц), со стажем употребления алкоголя не менее 3 и не более 10 лет. Для исключения прямого действия этанола на исследуемые параметры, взятие крови производили на 7-е сутки после поступления пациента в стационар. 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», а также заведующим диагностическим отделением, врачом ультразвуковой диагностики высшей квалификационной категории, Котовым Н. Б., на базе клинично-диагностического центра ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта». Анализ концентрации про- и противовоспалительных факторов (IL-6, IL-8, IL-10, TNF α и TGF- β 1) в сыворотке крови проводили с использованием твердофазного иммуноферментного метода (ELISA) согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Вектор Бест» Россия, DRG Diagnostics, Германия) на автоматическом анализаторе Lasurit (Dynex Technologies, США). Анализ полученных данных осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences).

Результаты и обсуждение. Регуляция воспалительных реакций в ответ на повреждение гепатоцитов осуществляется молекулами межклеточной кооперации – цитокинами, хемокинами, факторами роста и др., модулирующими процессы фиброгенеза *in vivo* [2, 3].

Провоспалительные цитокины стимулируют трансформацию резидентных звездчатых клеток печени (ЗКП) в миофибробласты, продуцирующие компоненты ЭКМ 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 [2]. Выявленное нами достоверное повышение (по сравнению с контролем) концентрации TNF- α и IL-8 в сыворотке крови у больных АФП четко коррелировало со стадией фиброза (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 алкоголя выявлена повышенная продукция TNF- α и IL-8 разными клетками, в т.ч. клетками Купфера, индуцированная бактериальными токсинами (ЛПС), проникающими в системную циркуляцию вследствие повышенной проницаемости кишечной стенки и сниженной функции печени [4]. Опосредуемое IL-8 и TNF- α усиление продукции АФК и оксида азота гепатоцитами, приводит к дальнейшему их повреждению, обуславливая картину полиорганной недостаточности при острой и хронической АБП [3]. Кроме того, хемокин IL-8 обеспечивает интенсивный приток иммунных клеток, в т.ч. нейтрофилов, в очаг повреждения [4].

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 [5]. У обследованных нами пациентов с АПФ, достоверный рост IL-6 в сыворотке крови регистрировался только в терминальной стадии фиброза 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 ЗКП компонентов ЭКМ и замедляя его деградацию [5]. 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 ($p<0,05$). Достоверное увеличение (по сравнению с контролем) содержания IL-10 в сыворотке крови больных АФП было установ-

лено на начальной (в 1,5 раза) и терминальной (в 2,3 раза) стадиях фиброза. Выявленные изменения могут быть обусловлены универсальной реакцией иммунной системы, направленной на подавление избыточного системного воспаления, вследствие воздействия алкоголя.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что 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 сывороточных уровней молекул с противоположным действием, IL-10 и TGF- β 1, регистрируется на более продвинутых стадиях фиброза. 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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, V. 50(5), 491–498.
2. Barr T., Helms C., Grant K., Messaoudi I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016, 65, 242–51.
3. Kawaratani H., Tsujimoto T., Douhara A., Takaya H., Moriya K., Namisaki T., Noguchi R., Yoshiji H., Fujimoto M., Fukui H. The Effect of Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease. *Mediators of Inflammation*. 2013, 2013, 495156.
4. Neuman M. G., Maor Y., Nanau R. M., Melzer E., Mell H., Opris M., Cohen L., Malnick S. Alcoholic Liver Disease: Role of Cytokines. *Biomolecules*. 2015, 5(3), 2023–2034.
5. Li W., Amet T., Xing Y., Yang D., Liangpunsakul S., Puri P., Kamath P. S., Sanyal A. J., Shah V. H., Katz B. P., Radaeva S., Crabb D. W., Chalasani N., Yu Q. Alcohol abstinence ameliorates the dysregulated immune profiles in patients with alcoholic hepatitis: A prospective observational study. *Hepatology*. 2017, 66(2), 575–590.

EVALUATION OF THE CONTENT OF FIBROGENESIS FACTORS IN THE BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH ALCOHOLIC FIBROSIS OF LIVER

© 2018 N. D. Gazatova¹, K. A. Yurova¹, D. V. Gavrillov², 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

The content of pro- and anti-inflammatory cytokines was evaluated by the method of enzyme immunoassay in 58 patients with alcoholic liver fibrosis (AFP) ranked by the stage of fibrosis. In patients with AFP, abusing alcohol, a direct dependence of the serum content of proinflammatory molecules (IL-8 and TNF α , but not IL-6) was established depending on the stage of fibrosis. An increase in the level of anti-inflammatory factors—IL-10 and TGF- β 1 at the terminal stages of the fibrous process can be a compensatory mechanism aimed at suppressing excessive systemic inflammation, due to the effect of ethanol in this category of patients.

Key words: alcoholic liver fibrosis, pro and anti-inflammatory cytokines

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;

Gavrillov 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, Ph.D, Head of the Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies of the Federal State Unitary Enterprise “Baltic Federal University named after I. Kant”, Kaliningrad, Russia; E-mail: larisalitvinova@yandex.ru.