

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.36-004.4

Иванов А.С.¹, Тарасенко Е.В.¹, Гармаш И.В.¹, Мяндина Г.И.¹, Аришева О.С.¹, Желудова Е.М.¹,
Азова М.М.¹, Терехина Н.Н.², Баронец В.Ю.², Кобалава Ж.Д.¹

Влияние маркеров эндотелиальной дисфункции, цитокинового статуса, гена коллагена COL1A1_1 на развитие фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем

¹ Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России,
119034, г. Москва, Россия, Кропоткинский пер., д. 23

Фиброз печени и его конечная стадия – цирроз являются одной из причин летальных исходов при хронических заболеваниях печени. Алкоголь и его метаболиты вызывают накопление внеклеточного коллагена, приводящего к фиброзу, вследствие цитокинового дисбаланса, процессов фиброгенеза и фибролиза. **Цель.** Изучить иммуновоспалительные факторы, ассоциации полиморфизма гена коллагена I типа COL1A1_1 C/A (rs1107946) с развитием фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем. **Методика.** Генотипировано 46 пациентов с фиброзом печени, злоупотребляющих алкоголем (срок употребления алкоголя 15,6±9,5 лет). Группы сформированы в зависимости от стадии фиброза печени, определенного методом непрямого эластометрии: 1-я — F0+1 (n=20), 2-я — F3+4 (n=36). Критерии исключения: острый алкогольный гепатит, хронические заболевания печени неалкогольного генеза, общие воспалительные и аутоиммунные процессы. У всех больных определяли концентрации интерлейкина (ИЛ)-6, ИЛ-8, ФНО-альфа, VEGF-A, s-ICAM-1, ET-1. Полиморфизм гена COL1A1_1 определяли методом Real-Time PCR. В качестве контрольной группы полиморфизма гена коллагена были обследованы 30 здоровых мужчин и женщин. **Результаты.** Уровни ИЛ-6, ИЛ-8, s-ICAM-1, ET-1 зависели от степени алкогольного фиброза печени: во 2-й группе они были выше, чем в 1-й (p<0,05). Плотность печени статически значимо (p<0,05) коррелировала с уровнем ИЛ-6 (r=0,6), ИЛ-8 (r=0,77), s-ICAM-1 (r=0,58), ET-1 (r=0,56). Статически значимых различий уровней ФНО-альфа и VEGF-A между группами не выявлено (p>0,05). У больных с фиброзом печени, страдающих алкогольной зависимостью, частота встречаемости аллеля А статически значимо выше, чем в контрольной группе (38,3% против 12,5%, $\chi^2 = 7,6212$; p=0,005768). Частота гетерозигот СА существенно не отличается в группе больных и контрольной группе (38% и 25% соответственно, p=0,4425). Гомозиготы АА были выявлены только в группе больных с фиброзом печени, частота встречаемости составила 19,1%. **Заключение.** Выявлена прямая корреляционная связь между уровнем цитокинов (ИЛ-8, ИЛ-6), молекул эндотелиальной дисфункции (ЕТ1, sICAM-1) с уровнем фиброза печени. Наличие аллеля А гена COL1A1_1 может являться одним из генетических факторов развития фиброза печени у больных, злоупотребляющих алкоголем.

Ключевые слова: фиброз печени, эндотелиальная дисфункция, цитокины, коллаген, полиморфизмы, генетические маркеры.

Для цитирования: Иванов А.С., Тарасенко Е.В., Гармаш И.В., Мяндина Г.И., Аришева О.С., Желудова Е.М., Азова М.М., Терехина Н.Н., Баронец В.Ю., Кобалава Ж.Д. Влияние маркеров эндотелиальной дисфункции, цитокинового статуса, гена коллагена COL1A1_1 на развитие фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(3): 55-63.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.55-63

Для корреспонденции: Иванов Александр Сергеевич, аспирант Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН, каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. Моисеева В.С., e-mail: aleks_iv90@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.05.2018

Ivanov A.S.¹, Tarasenko E.V.¹, Garmasch I.V.¹, Myandina G.I.¹, Arisheva O.S.¹, Zheludova E.M.¹, Azova M.M.¹, Terexilina N.N.²,
Baronets V.Yu.², Kobalava Zh.D.¹

Markers of endothelial dysfunction, cytokine status, collagen COL1A1_1 gene on the development of liver fibrosis in alcohol abusers

¹ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),
Moscow, Russia;

² The Federal State Budgetary Institution "V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology" of the Ministry of Health of Russian Federation

Liver fibrosis and its final stage – cirrhosis is one of the causes of deaths in chronic liver diseases. Alcohol and its metabolites mediate the accumulation of extracellular collagen, leading to fibrosis mediated by cytokine imbalances, processes of fibrogenesis and fibrolysis.

The purpose. To investigate the immune-inflammatory factors and association between the *COL1A1_1* C/A (rs1107946) polymorphism and liver fibrosis in patients abusing alcohol.

Methods. 46 patients were genotyped (the period of alcohol consumption was 15.6±9.5 years) with liver fibrosis, alcohol abusers. They were divided into 2 groups depending on the stage of liver fibrosis: 1- F0+1, n=10; 2- F3+4, n=36. Exclusion criteria were chronic non-alcoholic liver disease, acute alcoholic hepatitis, general inflammatory and autoimmune diseases. We analyzed serum concentrations of interleukin (IL)-6, IL-8, TNF- α , VEGF-A, s-ICAM-1, ET-1 and polymorphism of the *COL1A1_1* gene was determined using the Real-Time PCR analysis. The stage of liver fibrosis was identified with the elastography method (FibroScan, Echosens, France). **Results.** The levels of IL-6, IL-8, s-ICAM-1, ET-1 depended on the degree of alcoholic liver fibrosis. The liver fibrosis was significantly correlated with the level of IL-6 ($r = 0.6$), IL-8 ($r = 0.77$), s-ICAM-1 ($r = 0.58$), ET-1 ($r = 0.56$) ($p < 0.05$). There were no significant differences in the levels of TNF-alpha and VEGF-A between two groups ($p > 0.05$). It was found that the frequency of allele A among patients was 38.3% which is significantly higher than in the control group (12.5%; $p = 0.005768$). The frequency of heterozygotes CA was not significantly different between the group of patients and the control group (38% and 25% respectively, $p = 0.4425$). Homozygous AA genotypes were revealed only in patients with liver fibrosis, the frequency was 19.1%. **Conclusion.** A positive correlation between the level of cytokines (IL-8, IL-6), endothelial dysfunction molecules (ET1, sICAM-1) and the level of liver fibrosis was revealed. The presence of allele A of the *COL1A1_1* gene may be one of the genetic factors involved in the development of liver fibrosis in patients abusing alcohol.

Keywords: liver fibrosis, collagen, cytokines, endothelial dysfunction polymorphisms, genetic markers.

For citation: Ivanov A.S., Tarasenko E.V., Garmash I.V., Myandina G.I., Arisheva O.S., Zheludova E.M., Azova M.M., Terebilina N.N., Baronets V.Yu., Kobalava Zh.D. Markers of endothelial dysfunction, cytokine status, collagen COL1A1_1 gene on the development of liver fibrosis in alcohol abusers. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(3): 55-63. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.55-63

For correspondence: Alexander S. Ivanov, a graduate student of the Medical Institute of the FSUE of VO "Russian University of Peoples Friendship" of the Department of Internal Diseases with a course in cardiology and functional diagnostics named after academician V. Moiseev e-mail: aleks_iv90@mail.ru, telephone 89629937685

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about authors.

Ivanov A.S., <https://orcid.org/0000-0001-6850-0800>

Tarasenko E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0665-9741>

Garmash I.V., <https://orcid.org/0000-0002-2950-3563>

Myandina G.I., <https://orcid.org/0000-0002-7613-326X>

Arisheva O.S., <https://orcid.org/0000-0002-2964-0568>

Zheludova E.M., <https://orcid.org/0000-0001-6208-5802>

Azova M.M., <https://orcid.org/0000-0002-7290-1196>

Terebilina N.N., <https://orcid.org/0000-0002-5356-0728>

Baronets V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-9715-4473>

Kobalava Zh.D., <https://orcid.org/0000-0002-5873-1768>

Received 18. 05.2019

Введение

Фиброз печени и его конечная стадия – цирроз являются одной из основных причин летальных исходов при хронических заболеваниях печени [1–4]. Основными причинами фиброза печени являются вирусные гепатиты В, С, D и злоупотребление алкоголем. Также к формированию фиброза приводят аутоиммунные заболевания печени, болезнь Вильсона-Коновалова, гемохроматоз, лекарственные поражения печени.

Употребление гепатотоксичных доз этанола (40–80 г/сут) в течение 10–12 лет приводит к развитию алкогольной болезни печени (АБП) [5]. Алкоголь и его метаболиты опосредуют накопление внеклеточного коллагена, приводящего к фиброзу, опосредованных

цитокиновым дисбалансом, процессами фиброгенеза и фибролиза.

К основным провоспалительным цитокинам, опосредующим экспрессию белков острой фазы макрофагами и гепатоцитами, инфильтрацию печени нейтрофилами, относят интерлейкин 6 (IL-6), интерлейкин 8 (IL-8) и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) [6–9].

Перестройка ткани печени в процессе воспаления и фиброза сопровождается портальной гипертензией, в основе которой лежит внутри- и внепеченочная дисфункция эндотелия [10]. Молекулы межклеточной адгезии (sICAM-1), эндотелин-1 (ET-1), васкуло-эндотелиальный фактор роста – А (VEGF-A) участвуют в

изменении внутрипеченочной микроциркуляции, ангиогенезе при гипоксии и воспалении, и являются маркерами повреждения эндотелия [11, 12].

В формировании и прогрессировании фиброза, также, важную роль играют и генетические факторы. Изучены полиморфизмы генов, кодирующих алкогольдегидрогеназу, альдегиддегидрогеназу [13], а также кодирующие воспалительные медиаторы, такие как TNF α , IL1 β , IL10, липополисахаридный рецептор CD14 и многие другие [14–17]. Кроме того, важную роль в формировании фиброза играют гены, контролирующие процессы гепатоцеллюлярного апоптоза и некроза (Bcl-xL, Fas) [5]. При формировании фиброза печени происходит значительное увеличение экстрацеллюлярного матрикса, в состав которого входит несколько типов молекул коллагена, структурные гликопротеины, гликозаминогликаны и гиалуронан. Кроме того, при формировании фиброза происходят изменения ультраструктуры коллагенов. Мутации, приводящие к нарушению структуры волокон коллагена, могут приводить к серьезным функциональным дефектам соединительной ткани и формированию фиброза печени [18].

Наиболее распространенным структурным компонентом различных тканей является коллаген 1-го типа. В печени найдено более 10 типов коллагена, в том числе 1-го, 3-го и 4-го типов, входящих в состав фибрилл. Коллаген печени участвует в формировании базальных мембран клеток, фиброзных септ и провоцирует перисиносуидальный фиброз. Молекула коллагена 1-го типа состоит из 3 полипептидных цепей, ее молекулярный вес составляет 290 кД. Цепи молекулы (две идентичных $\alpha 1$ и одна $\alpha 2$), отличаются по составу аминокислот. Тяжесть заболевания усиливается, когда мутации затрагивают ген *COL1A1*, кодирующий белок $\alpha 1$ -цепи коллагена I типа. Расположен он в хромосоме 17q21.33, содержит 51 экзон и состоит из 38 тыс п.н. Мутация представляет собой однонуклеотидную замену цитозина на аденин – C\A (*rs1107946*) [18].

Цель исследования – выявление иммунно-воспалительных факторов, участвующих в развитии фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем и изучение корреляции полиморфизма гена *COL1A1* C/A (*rs1107946*) при фиброзе печени (F0-F4) пациентов, имеющих алкогольную зависимость.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех па-

циентов. Работа одобрена этическим комитетом РУДН. В исследовании принимали участие 46 человек, из них 35 (76,6%) мужчин, злоупотребляющих алкоголем (срок употребления алкоголя 15,6 \pm 9,6 лет) с алкогольной болезнью печени, проходивших лечение в 64-й ГКБ г. Москвы или наблюдающихся амбулаторно в наркологическом диспансере № 6 Московского научно-практического центра наркологии г. Москвы (НД № 6 ГКУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ»). Алкогольный генез подтверждался фактом признания злоупотребления алкоголем самим пациентом и/или его родственниками, позитивными ответами на опросники CAGE и AUDIT, клиническими и лабораторными признаками хронической алкогольной интоксикации (ХАИ) [23, 24]. Из исследования исключали пациентов с серопозитивной реакцией на антитела к вирусам гепатита, страдающих хроническими заболеваниями печени неалкогольной этиологии, а также с острым алкогольным гепатитом, наличием отечно-асцитического синдрома с более чем 5-кратным повышением уровня трансаминаз [25].

Степень фиброза печени (F) определяли методом непрямой эластометрии с помощью аппарата «Фиброскан» (FibroScan) (Франция). Стадия F0 ставилась при показателе плотности печени до 5,8 кПа, F1 – от 5,9 до 7,2 кПа, F2 – от 7,3 до 9,5 кПа, F3 – от 9,6 до 12,5 кПа, F4 (цирроз) – более 12,5 кПа [25].

Все пациенты, злоупотребляющие алкоголем, были разделены на группы в зависимости от степени фиброза печени: группа I – пациенты с низкой степенью фиброза печени (F0+F1), группу II составили пациенты с выраженной степенью фиброза печени (F3+F4). Больных со 2-й степенью фиброза выявлено не было. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, индексу массы тела (ИМТ) и алкогольному анамнезу. Основные клинико-демографические показатели исследуемых групп представлены в табл. 1.

Через 7 сут после поступления в стационар на фоне гарантированной абстиненции (воздержания от употребления алкоголя) определяли содержание маркеров эндотелиальной дисфункции (ЭД) и цитокинов с использованием коммерческих ИФА наборов в лаборатории биохимии Национального научного центра наркологии – филиала ФГБУ НМИЦ ПН МЗ РФ им В.П. Сербского». Содержание IL-6, VEGF-A, s-ICAM-1, TNF- α в сыворотке крови определяли с использованием коммерческих ИФА-наборов фирмы Bender MedSystems (Австрия). ИЛ-8 – с помощью ИФА-набора фирмы Invitrogen (США). Эндотелин 1-21 определяли ИФА-набором фирмы Biomedica (Австрия). Из цельной крови выделяли тотальную ДНК на колонках с помощью набора реагентов «К-Сорб» (#EX-514, Син-

тол, Россия). В качестве референсных значений использовали концентрации маркеров 15 здоровых доноров, согласно методическим рекомендациям руководства соответствующих наборов. В качестве контрольной группы исследования полиморфизма гена коллагена были обследованы 30 здоровых мужчин и женщин без фиброза печени. Для генотипирования проводили выделение геномной ДНК из цельной крови. Кровь собирали в пробирки с EDTA и хранили при температуре -20 °С. ДНК выделяли из лейкоцитов крови наборами «ДНК-Экстран-1» производства ООО «Синтол». Полиморфизм гена COL1A1_1 определяли методом Real-Time PCR на амплификаторе CFX-96, BioRad.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica (версия 8.0 для Windows) и R-language с применением стандартных алгоритмов вариационной статистики в зависимости от характера распределения данных. С учетом малого размера выборки и проведенных тестов (критерии Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка, ящичная гистограмма), распределение большинства показателей не было ненормальным. Оценка статистической значимости различий между группами осуществлялась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ был осуществлен с использованием статистики Спирмена. Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых признаков использовали таблицы сопряженности и критерий хи- квадрат (χ^2) с поправкой Йейтса при ожи-

даемых частотах более 10 и точный критерий Фишера при ожидаемых частотах менее 10. Статистически значимыми считались результаты при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Низкая степень фиброза (F0+F1) была выявлена у 10 (21,7%) пациентов (нулевая у 7 (15,2%), 1-я – у 3 (6,5%), 2-я степень не встречалась), высокая степень фиброза (F3+F4) у 36 (80,9%) пациентов, в том числе 3-я у 2 (4,3%) и 4-я у 34 (76,6%) пациентов. Сравнительная характеристика сформированных групп представлена в табл. 2.

Статистически значимые отличия выявлены в группе с высокой степенью фиброза печени, в которой отмечалось повышение степени фиброза печени (60,5 [15,4;75] кПа), уровня С-РБ, ГГТП, общего билирубина, увеличение размера воротной вены и снижение уровня ХЭ, альбумина, гемоглобина, ПИ по сравнению с показателями группы с низкой степенью фиброза. Во всех группах наблюдалась сохранность функции почек (табл. 2). В группе тяжелого фиброза печени было зарегистрировано 3 летальных исхода.

Уровни цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции у пациентов, злоупотребляющих алкоголем. Во всех группах пациентов с АБП концентрация интерлейкинов 6 и 8 (IL-6 и IL-8) была выше референсных значений. В группе с выраженной стадией фиброза печени уровень IL-6 и IL-8 был статистически зна-

Таблица 1

Сравнительная характеристика пациентов, включенных в исследование (n=46)

Показатель	Группа I (n=10)	Группа II (n=36)
	Низкая степень фиброза печени (F0+1)	Высокая степень фиброза печени (F3+4)
Степень фиброза (F), %		
0	7 (70,0)	0
1	3 (30,0)	0
2	0	0
3	0	2 (5,6)
4	0	34 (94,4)
Плотность печени, кПа	4,45 [3,05;5,5]	60,5 [15,4;75]*
Возраст, годы	48,9±13,4	51,3±11,1
Пол М/Ж, n (%)	7 (70,0)/3(30,0)	28 (77,8)/8(22,2)
ИМТ, кг/м ²	31,1±7,9	26,1±4,4
Срок употребления алкоголя (годы)	18,5±9,4	15,5±9,6
Число положительных ответов по тесту CAGE	3,2±0,7	3,5±0,5
Число положительных ответов по тесту AUDIT	20,8±5,7	22,6±4,0

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (LQ-UQ); * – $p < 0,01$ между группами I и II; сравнительную характеристику рассчитывали по U-критерию Манна-Уитни.

чимо выше по сравнению с 1-й группой. Выявлена прямая корреляция между уровнем интерлейкинов и плотностью печени по данным эластометрии. Уровень TNF- α был выше референсных значений в обеих группах, при этом между группами статистически значимых различий выявлено не было. Не было выявлено ассоциаций между концентрацией TNF- α и плотностью печени (табл. 3).

Уровень васкуло-эндотелиального фактора роста-A и концентрация молекул межклеточной адгезии были выше референсных значений в группах, злоупотребляющих алкоголем. Концентрация s-ICAM-1 была статистически значимо выше у больных с выраженной стадией фиброза печени, по сравнению с группой F0+1, при этом выявлена прямая корреляция между плотностью печени и концентрацией s-ICAM-1. Уровень ET-1 был повышен только в группе выраженного фиброза, в то же время его концентрация ассоциировалась с плотностью печени (табл. 3).

Генетические детерминанты фиброгенеза. Проведен анализ частот встречаемости аллелей A и C, а также

генотипов CC, C/A и AA гена *COL1A1_1* у больных с фиброзом печени, страдающих алкогольной зависимостью. Согласно данным генетического анализа, частота встречаемости аллеля A в группе фиброза печени статистически значимо выше, чем в контрольной группе и составляет 38,3% ($\chi^2 = 7,6212$; $p = 0,005768$). Частота встречаемости аллеля A в контрольной группе составила 12,5%. Частота гетерозигот A значимо не различались в экспериментальной и контрольной группах и составляет 38% и 25% соответственно. Гомозиготы AA были выявлены только в группе больных с фиброзом печени (табл. 4).

Таким образом, уровень всех исследуемых цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции у лиц, злоупотребляющих алкоголем повышался. Однако, при тяжелом фиброзе печени ($\geq F3$) статистически значимо повышались только уровни IL-6, IL-8, s-ICAM-1 и ET-1.

По данным литературы наличие алкогольной болезни печени сопровождается изменением цитокинового профиля за счет нарастания концентраций IL-6,

Таблица 2

Сравнительная характеристика и лабораторные показатели пациентов, включенных в исследование (n=46)

Показатели	Группы пациентов	
	I. (F0+1) (n=10)	II. (F3+4) (n=36)
Гемоглобин, г/л (N 120-160)	145,0 [122;160]	110,0 [94;128,5]*
Лейкоциты, тыс/мкл (N 4-9)	7,8 [7,2;8,7]	6,9 [5,2;8,7]
Тромбоциты, тыс/мкл (N 180-400)	188,0 [134;334]	168,0 [139;253]
СОЭ, мм/час (N<15)	15,0 [12;35]	34,5 [10;49]
С-РБ мг/л (N 0-5)	2,1 [2;2,1]	13,4 [9,4;46]**
АЛТ, Ед/л (N 0-50)	31,2 [18;74]	30,4 [17,1;58,8]
АСТ, Ед/л (0-50)	39,0 [22,5;58,1]	71,1 [39,6;152,5]
ГГТП, Ед/л (N 0-55)	57,0 [39;105]	274,0 [104;409]*
Билирубин общий, мкмоль/л (N 3-21)	11,2 [9,1;23,4]	51,0 [15,4;162,4]**
ЩФ, Е/л (N 30-120)	89,0 [50,5;372,5]	165,0 [1123;203]
Общий белок, г/л (N 66-83)	75,0 [57,9;77,1]	68,3 [58,4;75]
Альбумин, г/л (N 35-52)	38,9 [38,4;40]	24,4 [22,2;32,3]*
Холестерин, ммоль/л (N 4,5-5,5)	4,6 [3,1;5,04]	3,9 [2,96;4,95]
Холинэстераза, Ед/л (N 3,93-11,5)	5,5 [4,1;6,1]	2,35 [1,95;3,45]**
ПИ, % (N 70-140)	92,5 [77;100]	58,0 [38,5;77,5]**
Креатинин, мкмоль/л (N 59-104)	84,5 [77;107]	77,0 [60;103]
Воротная вена, мм (N< 12 мм)	11,0 [11;12]	13,0 [12;14]*
Асцит, п %	0	26 (72,2)

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (LQ-UQ); * — $p < 0,01$; ** — $p < 0,05$ между группами I и II; сравнительная характеристика посчитана по U-критерию Манна-Уитни.

Таблица 3

Цитокины и маркеры ЭД у лиц, злоупотребляющих алкоголем

Показатели	Группы пациентов			r, p<0,05
	Референсные значения	I (F0+1) (n=10)	II (F3+4) (n=36)	
IL-6, пг/мл	0,5±0,2	2,38 [1,2;2,84]	13,0 [3,1;26] #	0,6
IL-8, пг/мл	0,4±0,3	1,6 [0,0;5,9]	30,7 [12,4;80,5] #	0,77
TNF-α, пг/мл	0,1±0,057	0,22 [0,22;0,24]	0,27 [0,22;0,29]	-
VEGF-A, пг/мл	273,6±38	746,8 [354,2;1827,2]	996,4 [428,6;1572,4]	-
s-ICAM, нг/мл	311±27	469,0 [288;645]	1120,0 [621;1569] #	0,58
ET-1, фмоль/мл	1,16±0,15	0,0 [0;0,2]	1,45 [0,5;2,8] #	0,56

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (LQ-UQ); # – p<0,05; между группами I и II; сравнительная характеристика посчитана по U-критерию Манна-Уитни; r – коэффициент корреляции Спирмана исследуемых параметров с плотностью печени по данным непрямой эластометрии.

IL-8 и TNF-α [19] и увеличение уровней IL-6 и IL-8 по мере прогрессирования заболевания печени [27]. Кроме того, у лиц, злоупотреблявших алкоголем, наиболее высокие концентрации IL-8 наблюдались при остром алкогольном гепатите, в то время как при циррозе печени чаще отмечалось умеренное повышение [20, 28], в другом исследовании IL-8 повышался только по сравнению со здоровыми добровольцами и не имел существенных изменений при прогрессировании заболевания [27]. В данном исследовании IL-6 и IL-8 повышались на фоне злоупотребления алкоголем и значимо увеличивались при прогрессировании фиброза.

При алкогольной болезни печени выявлено повышение уровня TNF-α в сыворотке крови [29]. Известно, что TNF-α способствует прогрессированию фиброза печени за счет активации других цитокинов, маркеров повреждения сосудов, апоптической активности, повышаясь при циррозе печени по сравнению со здоровыми людьми [19]. Наблюдается обратная корреляция с тяжестью заболевания печени при острой декомпенсации печеночной функции [30]. По нашим

данным повышение концентрации TNF-α наблюдалась у лиц, злоупотреблявших алкоголем, по сравнению с референсными значениями и не зависели от тяжести фиброза печени.

Маркеры эндотелиальной дисфункции изучены в меньшей степени, чем цитокины. В ранних исследованиях отмечалось повышение уровня s-ICAM-1 при длительном употреблении алкоголя [31], циррозе печени и остром алкогольном гепатите [32]. По нашим данным у лиц, злоупотребляющих алкоголем, наблюдалось повышение s-ICAM-1 выше референсных значений, при этом статистически значимое повышение отмечалось только при тяжелом фиброзе печени (≥F3). VEGF-A ассоциируется с развитием портальной гипертензии и изменениями микроциркуляции на фоне гипоксии и прогрессировании ЦП. Повышение концентрации VEGF-A наблюдалось у лиц на фоне злоупотребления алкоголем на различных стадиях поражения печени [33, 34]. По нашим данным концентрация молекул VEGF-A повышалась на фоне злоупотребления алкоголем, но не зависела от стадии фиброза печени.

Менее изученной является молекула ET-1. Известно, что концентрация ET-1 повышается при алкогольной болезни печени и коррелирует с прогрессированием фиброза и портальной гипертензией [11]. Наши данные показывают повышение уровней ET-1 только при тяжелом фиброзе печени и наличии прямой корреляции с плотностью печени.

Нами выявлена прямая корреляция маркеров воспаления (IL-6, IL-8) и маркеров эндотелиальной дисфункции (s-ICAM, ET-1) с плотностью печени, что соответствует данным других исследований [11, 19, 28, 35], что отражает роль процессов воспаления в фиброгенезе.

Таблица 4

Частоты аллелей и генотипов гена COL1A1_1 C/A (rs1107946) в исследованных выборках

Частоты генов и генотипов	Фиброз	Контроль (%)
A	38,3%	12,5%
C/C	40%	75%
C/A	38%	25%
A/A	19,1%	0%

Нами выявлены статистически значимые ассоциации между носительством аллеля А и гомозиготы АА с тяжестью фиброза печени. Аллель А, встречался значимо чаще в группе фиброза печени по сравнению с контролем (38,3 % и 12,5% соответственно), а гомозиготы АА были выявлены только в группе фиброза и не встречались в контрольной группе. Таким образом, можно предположить, что носительство аллеля А гена *COL1A1_1*, особенно в гомозиготном состоянии, может являться одним из генетических факторов развития фиброза печени у больных, злоупотребляющих алкоголем. Эти результаты соотносятся с данными литературы о накоплении коллагена I типа в ткани печени [18].

Таким образом, у лиц алкогольной болезнью печени отмечается повышение маркеров иммунно-воспалительных реакций и эндотелиальной дисфункции, особенно на выраженной стадии фиброза печени. Прогрессирование фиброза печени сопровождается изменением интерлейкинового профиля и маркеров эндотелиальной дисфункции, находящихся в прямой связи с плотностью ткани печени. Выявлена прямая корреляционная связь между уровнем цитокинов (IL-8, IL-6), молекул эндотелиальной дисфункции (ET-1, s-ICAM-1) с уровнем фиброза печени. Носительство аллеля А гена *COL1A1_1*, особенно в гомозиготном состоянии, может являться одним из генетических факторов развития фиброза печени у больных, злоупотребляющих алкоголем.

Литература

- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115: 209–18.
- Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 7312–24.
- Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct*. 2003; 28: 105–12.
- Мусин А.Г., Муталова Э.Г., Нигматуллина А.Э. и др. Современные аспекты механизмов фиброгенеза в печени. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2014; 9(3): 95–9.
- Rehm J, Taylor B, Mohapatra S et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev*. 2010; 29(4): 437–45.
- Rachakonda V, Gabbert C, Raina A et al. Stratification of risk of death in severe acute alcoholic hepatitis using a panel of adipokines and cytokines. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014; 38(11): 2712–21.
- Nicolaou C, Chatzipanagiotou S, Tzivosa D. Serum cytokine concentrations in alcohol-dependent individuals without liver disease. *Alcohol*. 2004; 32: 243–7.
- Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y et al. Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcohol, clinical and experimental research*. 2000; 24(4): 48–54.
- Swiatkowska-Stodulska R, Bakowska A, Drobińska-Jurowiecka A. Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Med Sci Monit*. 2006; 12(5): 215–20.
- Bosch J, Abraldes JG, Fernández M et al. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol*. 2010; 53: 558–67.
- Alam I, Bass NM, Bacchetti P et al. Hepatic tissue endothelin-1 levels in chronic liver disease correlate with disease severity and ascites. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95(1): 199–203.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of Biochemistry*. 2013; 153(1): 13–9.
- Огурцов П.П., Поликарпова Т.С., Гармаш И.В., Аришева О.С. и др. Биологические факторы риска развития алкогольной зависимости и алкогольного цирроза печени. *Вестник РУДН Серия «Медицина»*. 2012; 3: 26–30.
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*. 2006; 10: 76–99.
- De Minicis S et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*. 2007; 132: 1937–46.
- Nieto N. Oxidative stress and IL6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells in stellate cells. *Hepatology*. 2006; 44: 1487–501.
- Gressner O, Yagmur E, Lahme B et al. Differential effects of TGF beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol*. 2007; 47: 699–710.
- Горбунова В.Н., Кадурина Т.И. Коллагены и коллагеновые гены. *Медицинская генетика*. 2006; 5 (6): 3–10.
- Nagy LE. The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Reserch*. 2015; 37(2): 237–50.
- Kawaratan H, Tsujimoto T, Douhara A et al. The Effect of Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013: 495156.
- Райт А, Бростоф Дж, Мейл Д. *Иммунология*. Перевод с англ. Москва. 2000: 168–194.
- Dashwood MR, Loesch A. Endothelin-1 as a neuropeptide: neurotransmitter or neurovascular effects? *J Cell Commun Signal*. 2009; 4: 51–62.
- Гармаш И.В. Алкогольная болезнь печени. В кн. Моисеев В.С. Алкогольная болезнь. *Поражение внутренних органов*. М.; ГЭОТАР-Медиа; 104–15.
- EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease. *Journal of Hepatology*. 2012; 57: 399–420.
- Ledinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroentérol Clin Bio*. 2008; 32: 58–67.
- Pavlov CS. Transient elastography for diagnosis of stages of hepatic fibrosis and cirrhosis in people with alcoholic liver disease. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2017; 43 (1): 150.
- Балашова А.А., Аришева О.С., Гармаш И.В. и др. Цитокины и алкогольная болезнь печени. *Клиническая фармакология и терапия*. 2017; 26 (1): 41–6.
- Crews FT, Bechara R, Brown LA et al. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30: 720–30.
- McClain CJ, Barve S, Deaciuc I. Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22(5): 248–52.

30. Dirchwolf M, Podhorzer A, Marino M. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. *Cytokine*. 2016; 77: 14–25.
31. Sacanella E, Estruch R. The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. *Addict Biol*. 2003; 8(4): 371–8.
32. Rizk NM, Derbala MF. Genetic polymorphisms of ICAM 1 and IL28 as predictors of liver fibrosis severity and viral clearance in hepatitis C genotype 4. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013; 37 (3): 262–8.
33. Bosio D, Salvi V, Gagliostro V, Sozzani S. Angiogenic and antiangiogenic chemokines. *Chem Immunol Allergy*. 2014; 99: 89–104.
34. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis*. 2010; 30: 258–70.
35. Mándi Y, Nagy I, Krenács L. Relevance of ICAM-1 to alcoholic liver cirrhosis. *Pathobiology*. 1996; 64(1): 46–52.
14. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*. 2006; 10: 76–99.
15. De Minicis S et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*. 2007; 132: 1937–46.
16. Nieto N. Oxidativestress and IL6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells in stellate cells. *Hepatology*. 2006; 44: 487–501.
17. Gressner O, Yagmur E, Lahme B et al. Differential effects of TGF beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol*. 2007; 47: 699–710.
18. Gorbunova V.N., Kadurina T.I. Collagens and collagen genes. *Medit-sinskaya genetika*. 2006; 5(6): 3–10. (in Russian)
19. Nagy LE. The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Reserch*. 2015; 37(2): 237–50.
20. Kawaratan H, Tsujimoto T, Douhara A et al. The Effect of Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013: 495156
21. Rait A, Brostoff J, Mail D. *Immunology. Translation from English. Moscow*. 2000: 168–194. (in Russian)
22. Dashwood MR, Loesch A. Endothelin-1 as a neuropeptide: neurotransmitter or neurovascular effects? *J Cell Commun Signal*. 2009; 4: 51–62.
23. Garmash IV. Alcoholic liver disease In: Moiseev VS. *Alkohol'naya bolezni'. Porazhenie vnutrennih organov*. Moscow, GEHOTAR-Media; 104–15. (in Russian)
24. EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease. *Journal of Hepatology*. 2012; 57: 399–420.
25. Ledinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroentérol Clin Bio*. 2008; 32: 58–67.
26. Pavlov CS. Transient elastography for diagnosis of stages of hepatic fibrosis and cirrhosis in people with alcoholic liver disease. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2017; 43(1): 150.
27. Balashova AA, Arisheva OS, Garmash IV et al. Cytokines and alcoholic liver disease. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 2017; 26(1): 41–6 (in Russian)
28. Crews FT, Bechara R, Brown LA et al. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30: 720–30.
29. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I. Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22(5): 248–52.
30. Dirchwolf M, Podhorzer A, Marino M. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. *Cytokine*. 2016; 77: 14–25.
31. Sacanella E, Estruch R. The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. *Addict Biol*. 2003; 8(4): 371–8.
32. Rizk NM, Derbala MF. Genetic polymorphisms of ICAM 1 and IL28 as predictors of liver fibrosis severity and viral clearance in hepatitis C genotype 4. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013; 37 (3): 262–8.
33. Bosio D, Salvi V, Gagliostro V, Sozzani S. Angiogenic and antiangiogenic chemokines. *Chem Immunol Allergy*. 2014; 99: 89–104.
34. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis*. 2010; 30: 258–70.
35. Mándi Y, Nagy I, Krenács L. Relevance of ICAM-1 to alcoholic liver cirrhosis. *Pathobiology*. 1996; 64(1): 46–52.

Reference

1. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115: 209–18.
2. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 7312–24
3. Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct*. 2003; 28: 105–12.
4. Rehm J, Taylor B, Mohapatra S et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev*. 2010; 29(4): 437–45.
5. Musin A.G., Mutalova E.H.G., Nigmatullina A.E.H. et al. Modern aspects of mechanisms of liver fibrogenesis. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2014; 9(3): 95–9. (in Russian)
6. Rachakonda V, Gabbert C, Raina A et al. Stratification of risk of death in severe acute alcoholic hepatitis using a panel of adipokines and cytokines. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014; 38(11): 2712–21.
7. Nicolaou C, Chatzipanagiotou S, Tzivosa D. Serum cytokine concentrations in alcohol-dependent individuals without liver disease. *Alcohol*. 2004; 32: 243–7
8. Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y et al. Plasma endotoxin and serum cytokine levels in cpatients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcohol, clinical and experemental research*. 2000; 24(4): 48–54.
9. Swiatkowska-Stodulska R, Bakowska A, Drobińska-Jurowiecka A. Interleukin-8 in the blood serum of patients with alcoholic liver disease. *Med Sci Monit*. 2006; 12(5): 215–20.
10. Bosch J, Abraldes JG, Fernández M et al. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol*. 2010; 53: 558–67.
11. Alam I, Bass NM, Bacchetti P et al. Hepatic tissue endothelin-1 levels in chronic liver disease correlate with disease severity and ascites. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95(1): 199–203.
12. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of Biochemistry*. 2013; 153(1): 13–9.
13. Ogurcov P.P., Polikarpova T.S., Garmash I.V., Arisheva O.S. et al. Biological risk factors for the development of alcohol dependence and alcoholic cirrhosis. *Vestnik RUDN Seriya "Meditsina"*. 2012; 3: 26–30 (in Russian)

Сведения об авторах:

Иванов Александр Сергеевич, аспирант каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева МИ РУДН;

Тарасенко Екатерина Владимировна, канд. биол. наук, доцент, каф. биологии и общей генетики;

Гармаш Ирина Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева;

Мяндина Галина Ивановна, доктор биол. наук, проф. каф. биологии и общей генетики;

Аришева Ольга Сергеевна, канд. мед. наук, ассистент каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева;

Желудова Елена Михайловна, канд. биол. наук, доцент каф. биологии и общей генетики;

Азова Мадина Мухамедовна, доктор биол. наук, проф., зав. каф. биологии и общей генетики;

Теребилина Наталья Николаевна, канд. мед. наук, зав. лаб. биохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России;

Баронец Валерия Юрьевна, ст. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России;

Кобалава Жанна Давидовна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. акад. В.С. Моисеева Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН.