

Особенности некротически-воспалительного процесса при разных формах неалкогольной жировой болезни печени

И.В. КУРБАТОВА¹, О.П. ДУДАНОВА²

¹ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра РАН», Петрозаводск, Россия; ²ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

Резюме

Цель исследования. Выявление особенностей развития некротически-воспалительного процесса при разных формах неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) с помощью сравнительного анализа целого комплекса клинико-лабораторных показателей, в том числе цитокинового статуса и уровня экспрессии генов ферментов, регулирующих апоптоз периферических лейкоцитов.

Материалы и методы. Обследовали 86 больных с разными формами НАЖБП: 8 (9,3%) со стеатозом печени (СП), 70 (81,4%) с неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ): 40 — слабой активности (СА), 19 — умеренной активности (УА), 11 — высокой активности (ВА) и 8 (9,3%) с циррозом печени (ЦП). Контрольную группу составили 34 здоровых донора. Оценивали клинические, биохимические показатели крови, цитокиновый профиль, уровень транскриптов генов каспаз в лейкоцитах периферической крови (ЛПК).

Результаты. При стеатозе печени по сравнению с контролем повышен уровень α -фактора некроза опухоли и интерлейкина (ИЛ) 6, понижен уровень мРНК генов каспаз-3, -6 и -8 в ЛПК. При НАСГ концентрация ИЛ-10 выше, чем при стеатозе, и положительно коррелирует с уровнем провоспалительных цитокинов. Уровни α -фактора некроза опухоли и ИЛ-6 при НАСГ выше, чем в контроле. При прогрессировании НАСГ повышаются уровни С-реактивного белка, γ -глобулина, ИЛ-6, фрагмента цитокератина-18. При НАСГ транскрипционная активность гена каспазы-3 снижается относительно контроля и отрицательно коррелирует с уровнем провоспалительных цитокинов. При ЦП профиль экспрессии генов каспаз в ЛПК аналогичен профилю контрольной группы, уровень ИЛ-6 выше, чем при стеатозе и НАСГ, уровень ИЛ-1 β выше, чем при СП, положительно коррелируют уровень ИЛ-6 и активность аланин- и аспартатаминотрансферазы.

Заключение. Выявлены особенности некротически-воспалительного процесса при разных формах НАЖБП. Наряду с изменением общеклинической картины при прогрессировании НАЖБП изменяются цитокиновый профиль и уровни экспрессии генов каспаз в ЛПК.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, стеатоз, неалкогольный стеатогепатит, цирроз печени, воспаление, цитокины, каспазы, апоптоз.

Features of a necrotic and inflammatory process in different forms of nonalcoholic fatty liver disease

I.V. KURBATOVA¹, O.P. DUDANOVA²

¹Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia; ²Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

Aim. To identify the features of development of a necrotic and inflammatory process in different forms of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), by comparatively analyzing a full set of clinical and laboratory parameters, including the cytokine status and the expression level of enzyme genes controlling the apoptosis of peripheral leukocytes.

Subjects and methods 86 patients with NAFLD, including 8 (9.3%) with hepatic steatosis (HS), 70 (81.4%) with nonalcoholic steatohepatitis (NASH), 40, 19, and 11 with mild, moderate, and high disease activity, respectively, and 8 (9.3%) with liver cirrhosis (LC), were examined. A control group consisted of 34 healthy donors. Clinical and biochemical blood indices, cytokine profile, and the level of caspase gene transcripts in the peripheral blood leukocytes (PBL) were estimated.

Results. As compared to the controls, the patients with HS had higher tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) levels and lower caspase 3, 6, and 8 mRNA in PBL. The concentration of IL-10 in NASH was higher than that in steatosis and positively correlated with the level of proinflammatory cytokines. The levels of TNF- α and IL6 were higher in the patients with NASH than in the controls. Those of C-reactive protein, γ -globulin, IL-6, and cytokeratin-18 fragment increased with the progression of NASH. In the latter, the transcriptional activity of caspase-3 gene decreased relative to the reference value and negatively correlated with the level of proinflammatory cytokines. In the patients with LC, the gene expression profile of caspases in PBL was similar to that in the control group; the level of IL-6 was higher than that in steatosis and NASH, that of IL-1 β was higher than in HS and positively correlated the concentration of IL-6 and the activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase.

Conclusion. The features of a necrotic and inflammatory process were identified in different forms of NAFLD. When the latter progressed, the cytokine profile and gene expression levels of caspases in PBL altered along with a change in the general clinical picture.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease, steatosis, nonalcoholic steatohepatitis, liver cirrhosis, inflammation, cytokines, caspases, apoptosis.

Сведения об авторах:

Дуданова Ольга Петровна — д.м.н., проф., зав. каф. пропедевтики внутренних болезней и гигиены

Контактная информация:

Курбатова Ирина Валерьевна — к.б.н., н.с. лаб. генетики ИБ КарНЦ РАН; 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская 11; тел.: +7(814)257-1879; e-mail: irina7m@yandex.ru

АлАТ — аланинаминотрансфераза
 АсАТ — аспаратаминотрансфераза
 ИЛ-10 — интерлейкин 10
 ИЛ-1 β — интерлейкин 1 бета
 ИЛ-6 — интерлейкин 6
 ИФА — иммуноферментный анализ
 ЛПВП — липопротеины высокой плотности
 ЛПК — лейкоциты периферической крови
 ЛПНП — липопротеины низкой плотности
 НАЖБП — неалкогольная жировая болезнь печени
 НАСГ-ВА — неалкогольный стеатогепатит высокой активности

НАСГ-СА — неалкогольный стеатогепатит слабой активности
 НАСГ-УА — неалкогольный стеатогепатит умеренной активности
 ОХС — общий холестерин
 СРБ — С-реактивный белок
 СП — стеатоз печени
 ТГ — триглицериды
 ТПС — тканевый полипептидспецифический антиген
 ЦП — цирроз печени
 ЩФ — щелочная фосфатаза
 TNF α (tumor necrosis factor alpha) — α -фактор некроза опухоли

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — распространенное хроническое метаболическое мультифакторное заболевание, основными клинко-морфологическими формами которого служат стеатоз, стеатогепатит, фиброз и цирроз печени (ЦП). Главные звенья сложного патогенеза НАЖБП представлены формированием инсулинорезистентности, цитотоксическим действием избытка свободных жирных кислот и воспалением [1]. В настоящее время механизмы прогрессирования НАЖБП остаются невыясненными. Все большее внимание исследователей привлекает изучение вялотекущей воспалительной реакции, ассоциированной с ожирением как одного из главных компонентов развития НАЖБП [2, 3].

Известно, что основными медиаторами воспалительного процесса при прогрессировании НАЖБП являются цитокины, некоторым из них, например интерлейкину-6 (ИЛ-6) и α -фактору некроза опухоли (TNF α), отводится ключевая роль в этом процессе [4, 5]. Показано, что провоспалительные цитокины также участвуют в регуляции программируемой смерти клетки, в частности каспазозависимого апоптоза, который играет важную роль в развитии заболеваний печени [6]. Кроме процессов воспаления и апоптоза цитокины также вовлечены в регуляцию некроза и фиброгенеза [7, 8]. Несмотря на то что накоплены знания о плейотропном действии цитокинов, биохимические и молекулярные механизмы вовлечения цитокинов в прогрессирование НАЖБП остаются неясными. Рядом исследователей предприняты попытки оценить роль некоторых цитокинов в развитии НАЖБП [5, 9, 10], но, как правило, авторы не проводят сравнительный анализ изучаемых показателей у пациентов с разными клинко-морфологическими формами НАЖБП. Кроме того, в литературе мало информации об интенсивности апоптоза лейкоцитов периферической крови (ЛПК) при НАЖБП, в то время как они являются главными клетками, реализующими иммуновоспалительный процесс в печени и ответственными за прогрессирование печеночно-клеточной недостаточности.

Цель исследования — выявление особенностей развития некротически-воспалительного процесса при разных формах НАЖБП с помощью сравнительного анализа целого комплекса клинко-лабораторных показателей, в том числе цитокинового статуса и уровня экспрессии генов ферментов, регулирующих апоптоз ЛПК.

Материалы и методы

Обследовали 86 больных НАЖБП: 8 (9,3%) со стеатозом печени (СП), 70 (81,4%) с неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ): 40 слабой активности (СА), 19 умеренной активности (УА) и 11

— высокой активности (ВА) и 8 (9,3%) — с ЦП. Контрольную группу составили 34 здоровых донора. Клиническая характеристика групп приведена в табл. 1. Диагноз верифицировали на основании традиционных клинических, лабораторных, инструментальных и гистологических данных. Оценивали печеночные функциональные пробы: активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), уровень общего и прямого билирубина, альбумина, γ -глобулина, протромбина, общего холестерина (ОХС), липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов (ТГ), С-реактивного белка (СРБ) (на анализаторе Random Access F-15 («BioSystems», Испания). Выполняли ультразвуковое исследование органов брюшной полости (аппарат Vivid Pro-7, «General Electric», США) с оценкой эхогенности и размеров печени, размеров селезенки, наличия асцита; при доплерографии определяли диаметры воротной и селезеночной вен и линейную скорость кровотока в них для выявления портальной гипертензии. При эзофагогастроскопии оценивали наличие варикозного расширения вен пищевода и кардиального отдела желудка. Ряду больных выполняли спиральную компьютерную томографию печени с оценкой плотности печени и слепую чрескожную пункционную биопсию печени с оценкой степени активности и фиброза по методу Brunt [11]. У всех пациентов был исключен вирусный, алкогольный, лекарственный и аутоиммунный генез поражения печени. Среди обследованных не было больных сахарным диабетом.

Содержание тканевого полипептидспецифического антигена (ТПС) (фрагменты цитокератина-18) в крови определяли методом неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы TPS ELISA («Biotec», Швеция). Концентрацию цитокинов в крови определяли методом неконкурентного ИФА с помощью тест-систем Интерлейкин-1бета (ИЛ-1 β) — ИФА-Бест, Интерлейкин-6 — ИФА-Бест, Интерлейкин-10 (ИЛ-10) — ИФА-Бест («Вектор-Бест», Россия) и Human TNF α Platinum ELISA («Bioscience», Австрия). Результаты ИФА регистрировали на анализаторе Sunrise («Tecan», Швейцария).

Для определения уровня транскриптов генов каспаз из цельной крови выделяли ЛПК методом, основанным на способности изотонического раствора хлорида аммония гемолизировать эритроциты. Тотальную РНК из ЛПК выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). Первую цепь комплементарной ДНК синтезировали из 5 мкг тотальной РНК с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия). Степень чистоты и концентрацию кДНК определяли на приборе SmartSpecPlus («Bio-Rad», США). Уровень транскриптов генов в ЛПК оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 («Bio-Rad», США), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Евроген», Россия). Для амплификации генов каспаз-3, -6 и -9 использованы праймеры, указанные в работах [12, 13]. Праймеры для амплификации гена *GAPDH*: прямой 5'-gaagtggaagtcggagtc-3', обратный 5'-gaagatggatggatggatgg-3'. Праймеры для амплификации гена каспазы-8: прямой 5'-ggctcactgaacctgggaata-3', обратный 5'-cagatcttcaactgcccagttgt-3'. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением фрагментов ПЦР. Уровень транскриптов изучаемых генов рассчитан относительно уровня транс-

криптона гена *GAPDH* по [14]. При анализе с помощью ПЦР использована двукратная повторность. Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН.

От всех обследованных получено информированное согласие. Исследование одобрено Комитетом по медицинской этике Минздравсоцразвития РК и ПетрГУ.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программного обеспечения StatGraphics 2.1. Проводили тест на соответствие результатов нормальному распределению. Для оценки различий биохимических показателей в группах исследования использовали непараметрический критерий *U* Вилкоксона—Манна—Уитни. Взаимосвязь показателей оценивали при помощи метода ранговой корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Данные указаны в виде среднего арифметического (M) $\pm$ стандартная ошибка среднего (m).

Результаты

Результаты сравнительного анализа клинко-лабораторных данных у здоровых доноров и пациентов с разными формами НАЖБП представлены в табл. 1. У доноров контрольной группы значения всех изучаемых биохимических показателей находятся в пределах клинической нормы. У пациентов по мере прогрессирования НАЖБП от стеатоза к НАСГ-ВА наблюдается повышение уровня маркеров цитолитического и холестатического синдро-

мов — АлАТ, АсАТ, ЩФ. Концентрация общего и прямого билирубина значительно возрастает только у больных ЦП, одновременно у этих же больных достоверно снижается уровень протромбина. С ростом активности НАСГ регистрируется более высокий уровень ОХС, главным образом за счет увеличения концентрации ЛПНП.

По мере прогрессирования НАЖБП закономерно увеличиваются маркеры мезенхимально-воспалительного синдрома — СРБ и γ -глобулины, достигая максимального уровня при НАСГ-ВА и незначительно снижаясь при ЦП. Та же закономерность наблюдается для ТПС, уровень которого возрастает более чем в 5 раз при НАСГ-ВА по сравнению с таковым при СП. У больных НАЖБП на стадии ЦП все функциональные печеночные тесты, за исключением ЛПНП и γ -глобулинов, достоверно отличаются от таковых у здоровых лиц (см. табл. 1). Из-за уменьшения массы паренхиматозной ткани при ЦП активность аминотрансфераз снижается по сравнению с таковой при НАСГ-ВА, а уровень ЩФ достоверно не отличается от такового при НАСГ-УА и НАСГ-ВА. Содержание ЛПВП у пациентов с ЦП достоверно не отличается от такового у больных НАСГ умеренной и высокой активности, но является достоверно более низким, чем у лиц других групп.

При сравнительном анализе цитокинового профиля у здоровых доноров и пациентов с разными формами НАЖБП выявляются следующие особенности (табл. 2).

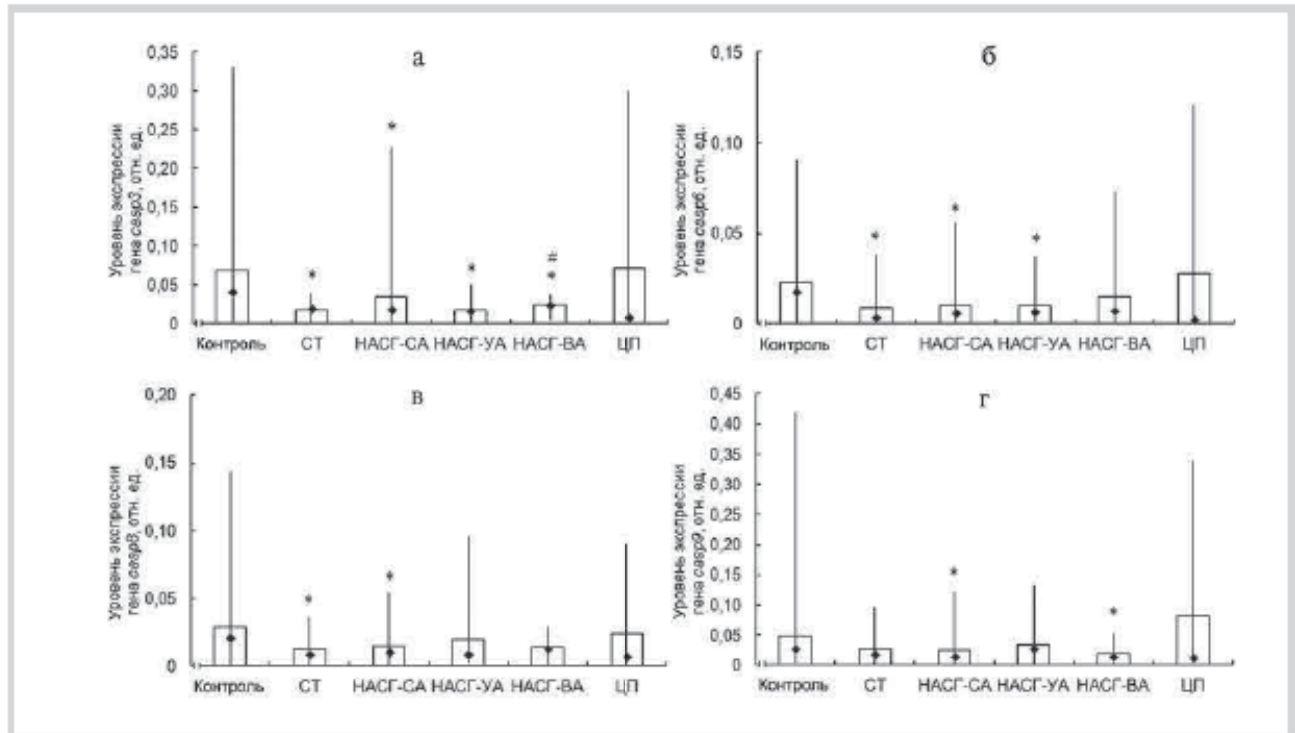
Таблица 1. Клиническая характеристика групп

Показатель	Контроль	СП	НАСГ-СА	НАСГ-УА	НАСГ-ВА	ЦП
Всего доноров	34	8	40	19	11	8
Возраст, годы	47,39 $\pm$ 2,48	53,00 $\pm$ 3,99	51,08 $\pm$ 1,88	47,83 $\pm$ 2,72	46,40 $\pm$ 4,31	53,88 $\pm$ 1,88
Мужчины/женщины	18/16	4/4	18/22	12/7	6/5	4/4
АлАТ, ед/л	16,81 $\pm$ 1,60	25,06 $\pm$ 3,11*	36,78 $\pm$ 3,33**	82,57 $\pm$ 7,41***	192,74 $\pm$ 67,17***	33,83 $\pm$ 6,38***
АсАТ, ед/л	21,13 $\pm$ 1,24	22,01 $\pm$ 2,01	33,23 $\pm$ 2,69**	56,78 $\pm$ 5,27***	113,46 $\pm$ 44,02***	41,28 $\pm$ 8,90***
Билирубин общий, мкмоль/л	16,54 $\pm$ 4,03	13,73 $\pm$ 2,32	19,04 $\pm$ 1,90**	18,21 $\pm$ 2,52**	18,75 $\pm$ 2,46**	52,13 $\pm$ 12,71***
Билирубин прямой, мкмоль/л	5,45 $\pm$ 1,88	7,73 $\pm$ 1,80	8,44 $\pm$ 1,80	7,13 $\pm$ 1,24	6,84 $\pm$ 2,42	40,48 $\pm$ 10,52***
ЩФ, ед/л	125,83 $\pm$ 20,79	187,00 $\pm$ 10,08	177,02 $\pm$ 9,87*	215,08 $\pm$ 12,04***	278,67 $\pm$ 33,09***	205,20 $\pm$ 18,69***
Альбумин, г/л	43,47 $\pm$ 1,50	39,47 $\pm$ 1,49	40,40 $\pm$ 1,37	40,67 $\pm$ 1,47	41,53 $\pm$ 4,00	35,51 $\pm$ 3,27*
γ -Глобулин, г/л	12,32 $\pm$ 1,93	12,06 $\pm$ 2,02	12,48 $\pm$ 0,51	12,05 $\pm$ 1,40	19,23 $\pm$ 5,77***	15,23 $\pm$ 2,64
Протромбин, %	85,00 $\pm$ 7,93	84,11 $\pm$ 9,89	84,10 $\pm$ 3,26	97,00 $\pm$ 2,08*	101,50 $\pm$ 13,50	67,00 $\pm$ 3,52***
ОХС, ммоль/л	5,32 $\pm$ 0,29	4,86 $\pm$ 0,31	5,93 $\pm$ 0,17**	6,85 $\pm$ 0,49***	6,34 $\pm$ 0,30**	6,21 $\pm$ 0,46**
ЛПВП, ммоль/л	1,48 $\pm$ 0,10	1,19 $\pm$ 0,06*	1,27 $\pm$ 0,07*	1,20 $\pm$ 0,12*	1,24 $\pm$ 0,19*	0,96 $\pm$ 0,19***
ЛПНП, ммоль/л	3,36 $\pm$ 0,27	2,46 $\pm$ 0,49	3,76 $\pm$ 0,15 Δ	4,35 $\pm$ 0,33***	3,78 $\pm$ 0,44 Δ	3,71 $\pm$ 0,74 Δ
ТГ, ммоль/л	1,60 $\pm$ 0,20	2,20 $\pm$ 0,18	2,50 $\pm$ 0,57*	3,81 $\pm$ 1,59*	3,05 $\pm$ 0,27*	3,39 $\pm$ 0,19*
СРБ, мг/л	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,11 $\pm$ 1,27**	2,31 $\pm$ 1,29**	7,00 $\pm$ 3,12**	5,60 $\pm$ 1,60**
ТПС, ед/л	112,35 $\pm$ 19,22	106,39 $\pm$ 35,43	221,75 $\pm$ 45,07	318,92 $\pm$ 65,54***	596,52 $\pm$ 182,70***	НД

Примечание. Здесь и в табл. 2: данные представлены в виде $M \pm m$. Достоверные отличия (согласно критерию *U* Вилкоксона—Манна—Уитни) по сравнению с группой * — контрольной, ** — СП, # — НАСГ-СА, ## — НАСГ-УА, Δ — НАСГ-ВА. НД — нет данных.

Таблица 2. Содержание цитокинов в плазме крови у пациентов с НАЖБП и у доноров контрольной группы

Цитокин	Контроль	СП	НАСГ-СА	НАСГ-УА	НАСГ-ВА	ЦП
TNF- α , пг/мл	4,77 $\pm$ 0,46	7,32 $\pm$ 0,02*	6,60 $\pm$ 0,67*	6,32 $\pm$ 0,53*	6,36 $\pm$ 0,34*	6,93 $\pm$ 0,69*
ИЛ-10, пг/мл	6,53 $\pm$ 0,89	3,92 $\pm$ 0,22	17,17 $\pm$ 2,67**	16,73 $\pm$ 2,96**	11,90 $\pm$ 1,82**	18,63 $\pm$ 6,74**
ИЛ-1 β , пг/мл	3,61 $\pm$ 0,63	2,42 $\pm$ 0,33	5,41 $\pm$ 1,35	5,09 $\pm$ 1,67	2,91 $\pm$ 0,48	5,54 $\pm$ 0,87**
ИЛ-6, пг/мл	3,29 $\pm$ 0,67	3,92 $\pm$ 0,22*	6,24 $\pm$ 1,00*	6,30 $\pm$ 1,42*	8,13 $\pm$ 2,46**	40,72 $\pm$ 10,40***



Уровень экспрессии мРНК генов каспаз-3 (а), -6 (б), -8 (в), -9 (г) в ЛПК у пациентов с НАЖБП и доноров контрольной группы.

Достоверные отличия (согласно критерию *U* Вилкоксона—Манна—Уитни) по сравнению с * — контрольной, # — НАСГ-УА. Столбцы представляют средние значения, бары — диапазон значений от минимального до максимального, ♦ — медиана.

Содержание TNF α у пациентов с НАЖБП повышается по сравнению с контролем и не различается в зависимости от формы НАЖБП. Концентрация ИЛ-10 при СП соответствует норме, но достоверно повышается при НАСГ и ЦП. Отмечается некоторое повышение уровня ИЛ-1 β у больных ЦП по сравнению со здоровыми лицами и пациентами со СП. Уровень ИЛ-6 в целом при НАЖБП превышает таковой в контрольной группе, а среди форм НАЖБП содержание данного цитокина достоверно выше при НАСГ-БА, чем при СП, и максимума достигает при ЦП.

Результаты сравнительного анализа уровней транскриптов генов каспаз в ЛПК у доноров и пациентов НАЖБП представлены на рисунке. Четко видно (рисунк, а), что при СП и НАСГ всех степеней активности уровень мРНК гена каспазы-3 ниже, чем в контроле. Та же закономерность прослеживается и в отношении каспазы-6, за исключением НАСГ-БА (см. рисунок, б). Уровень экспрессии гена каспазы-8 в ЛПК при СП и НАСГ-СА достоверно ниже, чем в контроле (рисунк, в), и уровни транскриптов каспазы-9 при НАСГ-СА и НАСГ-БА также ниже, чем в контроле (рисунк, г). В то же время профиль экспрессии генов каспаз у пациентов с ЦП аналогичен профилю доноров контрольной группы. В целом, несмотря на почти полное отсутствие достоверных различий уровней мРНК генов у пациентов с разными формами НАЖБП, можно выявить тенденцию к повышению их экспрессии у больных ЦП (до уровня контроля) по сравнению с пациентами НАСГ. Это связано с тем, что максимальные уровни мРНК генов каспаз-3, -6 и -9 при ЦП значительно выше, чем при НАСГ.

Для выявления взаимосвязей экспрессии генов каспаз в ЛПК, показателей крови и уровней цитокинов при разных формах НАЖБП нами проведен корреляционный анализ по Спирмену между данными показателями. При этом выявлена при НАСГ-СА отрицательная корреляция между уровнем мРНК гена каспазы-3 в ЛПК и концентрацией TNF α ($r_s = -0,589$; $p = 0,034$), положительная корреляция между уровнями ИЛ-10 и ИЛ-1 β ($r_s = 0,809$; $p = 0,005$). При НАСГ-БА обнаружена отрицательная корреляция между уровнем транскриптов гена каспазы-3 и концентрацией ИЛ-6 ($r_s = -0,711$; $p = 0,020$), положительные корреляции между уровнями ИЛ-10 и ИЛ-6 ($r_s = 0,690$; $p = 0,015$) и между ИЛ-10 и ИЛ-1 β ($r_s = +0,712$; $p = 0,008$). При ЦП положительная корреляция отмечалась между концентрацией ИЛ-6 и активностью АлАТ ($r_s = 0,803$; $p = 0,020$) и АсАТ ($r_s = 0,799$; $p = 0,024$).

Обсуждение

У пациентов с самой начальной стадией развития НАЖБП — со СП — уже выявлялись измененные функциональные печеночные тесты: увеличивалась активность АлАТ, ЩФ и снижался уровень ЛПВП. Это свидетельствовало о повреждении цитоплазматических мембран, формировании внутрипеченочного холестаза и снижении синтеза ЛПВП. Одновременно отмечалось повышение уровня TNF α при нормальном уровне ИЛ-6. Из литературы известно, что эти цитокины служат маркерами иммунновоспалительного процесса [15], их гиперпродукция часто наблюдается у пациентов с НАЖБП, и им отводится

ведущая роль в прогрессировании данного заболевания [4]. У обследованных пациентов с разными формами НАЖБП мы не выявили увеличение концентрации TNF α по мере развития НАЖБП от СП до ЦП. Учитывая важную роль TNF α как маркера клеточных иммунных реакций и индуктора активности макрофагов, можно сделать вывод, что значительного прогрессирования иммунных реакций клеточного типа при развитии НАЖБП от СП до ЦП не происходило, и большую роль играли гуморальные эффекторные механизмы. Это подтверждалось увеличением концентрации ИЛ-10, который подавляет Th1-хелперы и макрофаги, и концентрации иммуноглобулинов. В то же время некоторые авторы находят корреляцию уровня TNF α со степенью инсулинорезистентности и фиброза [16, 17]. TNF α в гепатоцитах, с одной стороны, может выступать в качестве индуктора апоптоза, реализуя передачу сигнала на каспазный каскад, а, с другой — способен подавлять этот процесс, активируя сигнальный путь NF- κ B [15]. Возможно, поэтому при повышенном уровне TNF α у пациентов со СП и другими формами НАЖБП нами зарегистрирован более низкий уровень мРНК генов каспаз-3, -6 и -8 по сравнению с контролем.

При НАСГ по сравнению со СП наряду с увеличением показателей повреждения печеночных клеток (АлАТ, АсАТ, ЩФ) и дислипидемией (увеличение уровня ЛПНП) наблюдаются изменения цитокинового профиля — значительно вырастает уровень ИЛ-10. Данный цитокин обладает противовоспалительным, иммуномодулирующим и иммуносупрессивным свойствами. Некоторые исследователи отмечают снижение уровня ИЛ-10 при НАЖБП, объясняя это защитной реакцией иммунитета на фиброгенез [18]. Однако роль ИЛ-10 в регуляции фиброгенеза не однозначна [19]. Нужно отметить, что у пациентов с НАСГ-ВА мы определили более высокий уровень γ -глобулинов по сравнению с таковым при СП и НАСГ-СА и НАСГ-УА, а это свидетельствует об активации специфического гуморального иммунитета. Таким образом, наблюдаемое нами повышение уровня ИЛ-10 при прогрессировании от СП к НАСГ-ВА может отражать активацию иммунного ответа организма на воспалительный процесс, в результате чего увеличивается секреция ИЛ-10 как противовоспалительного агента продуцирующими клетками (Т-хелперами, В-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами, тучными клетками). Это предположение косвенно подтверждается наличием положительной корреляции между уровнем ИЛ-10 и концентрацией провоспалительных цитокинов у пациентов с НАСГ. Так, у пациентов с НАСГ-СА обнаружена сильная корреляция между уровнями ИЛ-10 и ИЛ-1 β в крови, у пациентов с НАСГ-ВА уровень ИЛ-10 положительно коррелирует с содержанием ИЛ-6 и ИЛ-1 β в крови. Уровни провоспалительных цитокинов TNF α и ИЛ-6 при НАСГ выше, чем в контроле, при этом уровень ИЛ-6 имеет тенденцию к росту по мере увеличения активности НАСГ. Так, содержание ИЛ-6 при НАСГ-ВА достоверно выше, чем при СП. Нарастание интенсивности воспалительного процесса при прогрессировании НАСГ подтверждается также повышением содержания СРБ и γ -глобулинов.

Следует отметить снижение уровней мРНК изучаемых генов каспаз у пациентов с НАСГ разных степеней активности относительно контроля, причем только в ЛПК пациентов с НАСГ слабой активности это снижение

является достоверным. Однако по мере прогрессирования НАСГ наблюдается повышение концентрации фрагмента цитокератина-18 (ТПС), отщепляемого под действием каспазы-3. Известно, что ТПС образуется при апоптозе гепатоцитов и является сывороточным маркером данного явления при НАСГ [20]. Наши данные согласуются с данными литературы об усилении процессов апоптоза при НАЖБП [21], в то же время результаты настоящей работы могут свидетельствовать об отсутствии индукции апоптоза в ЛПК у пациентов с НАСГ. Приведенные факты наводят на мысль, что индукция и регуляция дегенерации ЛПК и гепатоцитов могут осуществляться разными механизмами. Например, цитокины могут выступать в качестве как индукторов, так и супрессоров программируемой гибели клеток, и их влияние на этот процесс зависит от типа ткани, стадии дифференцировки клеток [15]. Предположение, что повышение уровня провоспалительных цитокинов при развитии НАСГ может опосредовать снижение уровня активности процесса каспазозависимого апоптоза ЛПК подтверждается наличием отрицательной корреляции между уровнями провоспалительных цитокинов (TNF α у пациентов с НАСГ-СА, ИЛ-6 у пациентов с НАСГ-ВА) и уровнем мРНК гена эффекторной каспазы-3 в ЛПК. Возможно, сохранение популяции лейкоцитов необходимо для эффективного клеточно-опосредованного лизиса и фагоцитоза поврежденных гепатоцитов.

Результаты сравнительного анализа биохимических показателей у пациентов с НАЖБП на стадии ЦП свидетельствуют, что в процессе фиброгенеза и потери паренхиматозных клеток закономерно растет гипербилирубинемия и снижаются уровни аминотрансфераз и протромбина. Относительно цитокинового профиля при ЦП нами показано, что уровни TNF α , ИЛ-1 β и ИЛ-10 достоверно не отличаются от уровней данных цитокинов при НАСГ. В то же время концентрация ИЛ-6 у больных ЦП значительно превышает таковую у больных СП, НАСГ и тем более у здоровых лиц. ИЛ-6 является индуктором синтеза провоспалительных белков, на фоне их нарастающей секреции реактивные формы кислорода способствуют разобщению процесса окислительного фосфорилирования, истощению митохондриальной АТФ, что приводит к повреждению и некрозу гепатоцитов при ЦП [22]. Это подтверждается наличием положительных корреляций между содержанием ИЛ-6 и активностью АлАТ и АсАТ при ЦП. У пациентов с ЦП мы также выявили некоторое повышение уровня ИЛ-1 β по сравнению с контролем и группой СП. Известно, что ИЛ-1 β играет важную роль в индукции липогенеза и СП при ожирении [23].

В отличие от пациентов НАСГ, у которых уровень мРНК некоторых генов каспаз ниже, чем в контроле, профиль данных генов при ЦП аналогичен профилю доноров контрольной группы. При этом у пациентов с НАСГ обнаруживается взаимосвязь уровня провоспалительных цитокинов и уровня транскриптов генов каспаз в ЛПК, а у пациентов с ЦП — нет. Вероятно, уровень транскрипции генов каспаз в ЛПК при НАЖБП может зависеть от уровня индукции воспалительного процесса. Предполагаем, что генерализованный иммунный ответ, возникающий при ЦП на фоне портальной гипертензии и системной циркуляции антигенов, может опосредовать индукцию апоптоза ЛПК.

Заключение

Полученные данные подтвердили ведущую роль TNF α и ИЛ-6 в прогрессировании НАЖБП. Повышение концентрации этих провоспалительных цитокинов наблюдается уже при самой ранней стадии НАЖБП — при СП. При этом уровень TNF α не различается в зависимости от формы НАЖБП, тогда как содержание ИЛ-6 имеет тенденцию к повышению по мере нарастания интенсивности воспалительного процесса при прогрессировании НАСГ и значительно возрастает при ЦП, при котором гиперпродукция ИЛ-6 является одним из индукторов повреждения и некроза гепатоцитов. При переходе от стеатоза к НАСГ резко возрастает содержание ИЛ-10 в крови, при этом уровень ИЛ-10 стабильно выше нормы при НАСГ и ЦП. Вероятно, активация иммунного ответа при длительно текущем хроническом воспалении приводит к компенсаторному увеличению продукции ИЛ-10 как противовоспалительного агента.

В настоящей работе впервые показано, что в зависимости от формы НАЖБП различается профиль уровней экспрессии мРНК генов каспаз в ДПК. У пациентов со СП и НАСГ наблюдается снижение уровней мРНК гена эффекторной каспазы-3, а также других каспаз-6, -8 и -9 относительно контроля. Важно, что снижение транскрипционной активности гена эффекторной каспазы-3 наблюдается при СП и НАСГ всех степеней активности. Нами получены подтверждения того, что повышение уровня провоспалительных цитокинов при развитии НАСГ может опосредовать снижение уровня активности процесса каспазозависимого апоптоза ЛПК. При этом по мере прогрессирования НАСГ увеличивается активность апоптоза гепатоцитов. Об этом можно судить по увеличению в кро-

ви специфического показателя данного процесса — концентрации фрагмента цитокератина-18. Таким образом, процессы апоптоза гепатоцитов и ЛПК при НАЖБП могут регулироваться разными механизмами. В то же время полученные нами результаты свидетельствуют, что уровень транскрипции генов каспаз в ЛПК пациентов с НАЖБП может зависеть от уровня активности воспалительного процесса. При ЦП генерализованный иммунный ответ вследствие выраженного повреждения печеночных клеток и шунтирования крови при портальной гипертензии, вероятно, может опосредовать индукцию апоптоза ЛПК, о чем свидетельствует повышение уровня экспрессии генов каспаз у больных ЦП (до уровня контроля) по сравнению с пациентами с НАСГ.

Таким образом, в настоящем исследовании выявлены особенности некротически-воспалительного процесса при разных формах НАЖБП, обладающих потенциальной прогностической ценностью. Наряду с изменением общеклинической картины при прогрессировании НАЖБП изменяются цитокиновый профиль и уровни экспрессии генов каспаз в ЛПК.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (Тема № 0221-2014-0034). Работа также поддержана стипендией Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2015–2017 гг. Работа также выполнялась в рамках реализации Программы стратегического развития ПетрГУ на 2012–2016 гг.

Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stefan N, Kantartzis K, Häring HU. Causes and metabolic consequences of Fatty liver. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):939-960. doi:10.1210/er.2008-0009
2. Драпкина О.М., Деева Т.А., Волкова Н.П., Ивашкин В.Т. Современные подходы к диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени. *Терапевтический архив*. 2014;86(10):116-123.
3. Беспалова И.Д., Рязанцева Н.В., Калюжин В.В., Афанасьева Д.С., Мурашев Б.Ю., Осиков И.А. Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний *Сибирский медицинский журнал*. 2013;(2):5-9.
4. Brauersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2012;18(8):727-735. doi:10.3748/wjg.v18.i8.727
5. Стилиди Е.И. Роль фактора некроза опухоли альфа и интерлейкина-6 в патогенезе неалкогольного стеатогепатита. *Крымский терапевтический журнал*. 2012;(1):91-98.
6. Gucciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Seminars in Liver Disease*. 2010;30(4):402-410. doi:10.1055/s-0030-1267540
7. Copaci I, Micu L, Voiculescu M. The role of cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. A review. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2006;15(4):363-373.
8. Par A, Par G. Liver fibrosis: patho-physiology, diagnosis and treatment. *Orvosi Hetilap*. 2005;146(1):3-13.
9. Звягинцева Т.Д., Глушенко С.В. Липотоксический стресс и провоспалительные цитокины как факторы развития неалкогольного стеатогепатита. *Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация*. 2014;18(189):46-49.
10. Сивкова А.А., Ларева Н.В., Лузина Е.В. Патогенетическое значение цитокинов в формировании и прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени. *Сибирский медицинский журнал*. 2011;(4):56-58.
11. Brunt EM, Janney CG, Di isceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American Journal of Gastroenterology*. 1999;94(9):2467-2474. doi:10.1016/s0002-9270(99)00433-5
12. Bozec A, Ruffion A, Decaussin M, Andre J, Devonec M, Benahmed M, Mauduit C. Activation of caspases-3, -6, and -9 during finasteride treatment of benign prostatic hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(1):17-25. doi:10.1210/jc.2004-0712
13. Mrass P, Rendl M, Mildner M, Gruber F, Lengauer B, Ballaun C, Eckhart L, Tschachler E. Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Research*. 2004;64(18):6542-6548. doi:10.1158/0008-5472.can-04-1129

14. Livak KJ., Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
15. Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Franzoso G. Mechanisms of liver disease: cross-talk between the NF-kappaB and JNK pathways. *Biological Chemistry*. 2009;390(10):965-976. doi:10.1515/bc.2009.111
16. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(5):2409-2415. doi:10.1172/jci117936
17. Lesmana CR, Hasan I, Budihusodo U, Gani RA, Krisnuhoni E, Akbar N, Lesmana LA. Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Digestive Diseases*. 2009;10(3):201-206. doi:10.1111/j.1751-2980.2009.00386.x
18. Zahran WE, Salah El-Dien KA, Kamel PG, El-Sawaby AS. Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2012;28(2):141-146. doi:10.1007/s12291-012-0236-5
19. Tsukamoto H. Is interleukin-10 antifibrogenic in chronic liver injury? *Hepatology*. 1998;28(6):1707-1709. doi:10.1002/hep.510280635
20. Yilmaz Y. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 (the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease). *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2009;30(11-12):1103-1109. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04148.x
21. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *The American Journal of Gastroenterology*. 2004;99(9):1708-1717. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.40009.x
22. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;(114):147-152. doi:10.1172/jci200422422
23. Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, Matevossian A, Friedline RH, Jung D, Kim JK, Czech MP. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS One*. 2014;9(9):e107265. doi: 10.1371/journal.pone.0107265

Поступила 15.04.2016