

Биохимические и молекулярно-генетические показатели воспаления и апоптоза при циррозе печени как исходе прогрессирования неалкогольного стеатогепатита

И.В. Курбатова¹, Л.В. Топчиева¹, О.П. Дуданова², А.А. Шиповская²

¹Институт биологии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр "Карельский научный центр" Российской академии наук», лаборатория генетики, Петрозаводск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Медицинский институт, кафедра пропедевтики внутренних болезней и гигиены, Петрозаводск, Россия

Резюме

Цель исследования. Сравнительный анализ комплекса клинико-лабораторных показателей (в том числе содержания цитокинов в плазме крови и уровня экспрессии генов *TNF*, *IL6* в периферических лейкоцитах), а также уровня биохимических и молекулярно-генетических показателей апоптоза, таких как содержание тканевого полипептид-специфического антигена – ТПС – в крови, активность каспаз 3, 8 и 9 и уровень экспрессии кодирующих их генов в лейкоцитах периферической крови) у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) – с неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) разной активности, циррозом печени (ЦП) классов А и В и у доноров контрольной группы.

Материалы и методы. Обследовано 158 пациентов с НАЖБП: 116 больных с диагнозом НАСГ, установленным впервые (НАСГ слабой, умеренной и высокой активности) и 42 – с диагнозом НАЖБП на стадии ЦП, установленным впервые (ЦП классов А и В по Чайлд-Пью). Контрольную группу составили 54 здоровых донора. Оценивали клинические, биохимические показатели крови, цитокиновый профиль, содержание тканевого полипептид-специфического антигена, уровень транскрипции генов *TNF*, *IL6* и генов каспаз, а также активность каспаз в лейкоцитах периферической крови (ЛПК).

Результаты и обсуждение. При прогрессировании НАСГ в ЦП, наряду с изменениями общеклинической картины, изменяется цитокиновый профиль за счет повышения уровня интерлейкина-6 (ИЛ-6) и ИЛ-1β; в ЛПК увеличивается активность каспазы 9 и снижается активность каспазы 8 по сравнению с НАСГ, снижается уровень экспрессии гена *TNF* по сравнению с НАСГ высокой активности. Данные показатели можно рассматривать в качестве перспективных малоинвазивных маркеров прогрессирования НАЖБП в ЦП.

Заключение. При неалкогольном ЦП как исходе прогрессирования НАСГ изменения клинических показателей, свидетельствующие о развитии печеночно-клеточной недостаточности, нарушении белкового и липидного обмена, прогрессирующем воспалении, сопровождаются специфическими изменениями уровней биохимических и молекулярно-генетических показателей апоптоза и воспаления. При прогрессировании НАСГ в ЦП изменяется цитокиновый профиль за счет повышения уровней провоспалительных цитокинов, в ЛПК имеет место усиление процессов апоптоза, запускаемых по внутреннему пути, и снижение активности апоптоза, активируемого по внешнему пути.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, цирроз печени, воспаление, цитокины, апоптоз.

Для цитирования: Курбатова И.В., Топчиева Л.В., Дуданова О.П., Шиповская А.А. Биохимические и молекулярно-генетические показатели воспаления и апоптоза при циррозе печени как исходе прогрессирования неалкогольного стеатогепатита. *Терапевтический архив.* 2019; 91 (4): 21–27. DOI: 10.26442/00403660.2019.04.000057

Biochemical and molecular-genetic indicators of inflammation and apoptosis in liver cirrhosis as an outcome of the progression of non-alcoholic steatohepatitis

I.V. Kurbatova¹, L.V. Topchieva¹, O.P. Dudanova², A.A. Shipovskaya²

¹Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS), Laboratory for Genetics, Petrozavodsk, Russia;

²Petrozavodsk State University, Institute of Medicine, Department of Propaedeutics of Internal Diseases and Hygiene, Petrozavodsk, Russia

Aim. A comparative analysis of the complex of clinical and laboratory indicators (including the content of cytokines in blood plasma and the level of expression of *TNF* and *IL6* genes in peripheral leukocytes, as well as the level of biochemical and molecular-genetic indicators of apoptosis, such as the content of tissue polypeptide-specific antigen (TPS) in the blood, the activity of caspases 3, 8 and 9 and the expression level of the encoding genes in peripheral blood leukocytes) in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) of different activity, liver cirrhosis (LC) classes A and B and in the donors of control group.

Materials and methods. 158 patients with NAFLD were examined: 116 patients with NASH diagnosed for the first time (NASH of weak, moderate and high activity) and 42 patients with the NAFLD at the stage of liver cirrhosis diagnosed for the first time (classes A and B according to the Child-Pugh classification). The control group consisted of 54 healthy donors. The clinical blood biochemistry, cytokine profile, tissue polypeptide-specific antigen content, the level of the *TNF*, *IL6* gene and caspase gene transcription as well as caspase activity in peripheral blood leukocytes (PBL) were evaluated.

Results and discussion. In the progression of NASH to LC, together with changes in general clinical parameters, the cytokine profile are changed due to an increase in the level of IL-6 and IL-1β; in peripheral leukocytes, the activity of caspase 9 increases and the activity of caspase 8 decreases compared to NASH, and the level of the *TNF* gene expression decreases as compared to NASH of high activity. These parameters can be considered as promising minimally invasive markers of progression of NAFLD to LC.

Conclusion. In nonalcoholic cirrhosis as an outcome of the progression of non-alcoholic steatohepatitis changes in clinical parameters (indicating the development of hepatocellular deficiency, violation of protein and lipid metabolism, progressive inflammation) are accompanied by specific changes in levels of biochemical and molecular-genetic indicators of apoptosis and inflammation. With the progression of NASH to LC, the cytokine profile changes due to an increase in the level of proinflammatory cytokines, the apoptosis processes triggered by the internal pathway increase and the activity of apoptosis activated via the external pathway decreases in PBL.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), liver cirrhosis, inflammation, cytokines, apoptosis.

For citation: Kurbatova I.V., Topchieva L.V., Dudanova O.P., Shipovskaya A.A. Biochemical and molecular-genetic indicators of inflammation and apoptosis in liver cirrhosis as an outcome of the progression of non-alcoholic steatohepatitis. Therapeutic Archive. 2019; 91 (4): 21–27. DOI: 10.26442/00403660.2019.04.000057

АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспаргатаминотрансфераза
ИЛ – интерлейкин
ИФА – иммуноферментный анализ
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПК – лейкоциты периферической крови
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени
НАСГ – неалкогольный стеатогепатит
НАСГ-ВА – неалкогольный стеатогепатит высокой активности
НАСГ-СА – неалкогольный стеатогепатит слабой активности
НАСГ-УА – неалкогольный стеатогепатит умеренной активности

ОХС – общий холестерин
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
СРБ – С-реактивный белок
ТГ – триглицериды
ТПС – тканевый полипептид-специфический антиген
ФНО- α – фактор некроза опухоли- α
ЦП – цирроз печени
ЩФ – щелочная фосфатаза
IL6 (interleukin 6) – интерлейкин 6
TNF α (tumor necrosis factor alpha) – фактор некроза опухоли- α

Введение

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – широко распространенное хроническое, медленно прогрессирующее метаболическое мультифакториальное заболевание. В настоящее время особый интерес представляет проблема детализации патогенетических механизмов НАЖБП, лежащих в основе ее прогрессирования. Выделяют ряд клинико-морфологических форм НАЖБП: стеатоз, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), фиброз и цирроз печени (ЦП). НАЖБП отличается стадийностью течения от стеатоза к стеатогепатиту и ЦП. Патогенез НАЖБП представлен сложными механизмами, включающими запуск процессов воспаления и гибели гепатоцитов (некроз, апоптоз), инсулинорезистентности, активации звездчатых клеток, фиброгенеза, фиброза, в ходе которых формируется НАСГ, затем трансформирующийся в ЦП.

Стеатоз печени характеризуется доброкачественным клиническим течением, тогда как НАСГ отличается прогрессирующим течением с возможным развитием ЦП. У четверти пациентов со стеатозом печени возникает фиброз печени [1], в 15–20% случаев у пациентов с НАСГ в течение 20 лет формируются выраженный фиброз и ЦП. У пациентов с цирротической стадией НАСГ возможно развитие гепатоцеллюлярной карциномы [2].

ЦП является финальной стадией развития хронического гепатита, характеризуется развитием фиброза, полным нарушением дольковой и сосудистой архитектоники органа с образованием узлов-регенератов [3]. Единственным эффективным способом радикальной помощи пациентам со сформировавшимся ЦП является трансплантация печени, которую, к сожалению, не всегда можно выполнить своевременно [4]. При этом механизмы патогенеза и особенности клинического течения ЦП при НАЖБП на молекулярно-генетическом и биохимическом уровне остаются малоизученными. В связи с этим про-

блема прогрессирования НАЖБП в ЦП остается одной из самых актуальных проблем современной гастроэнтерологии.

Ранее мы проанализировали результаты исследований зарубежных и отечественных ученых, а также провели собственные исследования, касающиеся патофизиологических механизмов развития НАЖБП, диагностики, особенностей клинического течения и методов лечения НАЖБП [5]. В одной из работ мы показали, что наряду с изменением общеклинической картины при прогрессировании НАЖБП изменяются цитокиновый профиль и уровни экспрессии генов каспаз в периферических лейкоцитах. При этом основное внимание уделялось прогрессированию НАСГ при НАЖБП [6]. В связи со сложностью механизмов патогенеза НАЖБП и особой актуальностью проблемы прогрессирования НАЖБП в ЦП поставлена задача более детально оценить расширенный комплекс биохимических и молекулярно-генетических показателей воспаления и апоптоза при неалкогольном ЦП как исходе прогрессирования НАСГ.

Цель настоящей работы – сравнительный анализ комплекса клинико-лабораторных показателей, в том числе содержания цитокинов в плазме крови и уровня экспрессии генов *TNF* и *IL6* в периферических лейкоцитах, а также уровня биохимических и молекулярно-генетических показателей апоптоза, таких как содержание тканевого полипептид-специфического антигена (ТПС) в крови, активность каспаз 3, 8 и 9 и уровень экспрессии кодирующих их генов в лейкоцитах периферической крови, у пациентов с НАЖБП (с НАСГ разной активности, ЦП классов А и В) и у доноров контрольной группы.

Материалы и методы

Обследовано 158 больных НАЖБП: 116 пациентов с диагнозом НАСГ, установленным впервые [НАСГ слабой (СА), умеренной (УА) и высокой (ВА) активности] и 42 пациента с диагнозом НАЖБП на стадии ЦП, установленным впервые (ЦП классов А и В по Чайлд-Пью). Контрольную группу составили 54 здоровых донора (без клинических проявлений НАЖБП). Клиническая характеристика исследуемых групп приведена в **табл. 1**.

Сведения об авторах:

Топчиева Людмила Владимировна – к.б.н., в.н.с. лаб. генетики Института биологии КарНЦ РАН

Дуданова Ольга Петровна – д.м.н., проф., зав. каф. пропедевтики внутренних болезней и гигиены Медицинского института ФГБОУ ВО «ПетрГУ»

Шиповская Анастасия Андреевна – аспирант каф. пропедевтики внутренних болезней и гигиены Медицинского института ФГБОУ ВО «ПетрГУ»

Контактная информация:

Курбатова Ирина Валерьевна – к.б.н., н.с. лаб. генетики Института биологии КарНЦ РАН; тел.: +7(8142)57; e-mail: irina7m@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-7620-7065

Таблица 1. Клиническая характеристика групп

Показатель	Контроль	НАСГ-СА	НАСГ-УА	НАСГ-ВА	ЦП-А	ЦП-В
Число доноров	54	60	32	24	24	18
Возраст, годы	55,64±2,36 (54,11)	55,94±1,71 (56,03)	54,83±2,70 (55,27)	56,23±3,29 (56,04)	57,25±1,80 (56,37)	57,91±2,04 (56,44)
Число мужчин/женщин	25/29	30/30	17/15	12/12	12/12	9/9
АЛТ, Ед/л	17,62±1,82 (16,20)	34,78±1,94 (34,90)*	79,33±5,15 (71,00)*#	171,14±46,52 (116,95)*##**	40,60±8,19 (28,75)*##** [◊]	39,93±6,08 (41,80)*##** ^{◊,Δ}
АСТ, Ед/л	20,18±1,32 (18,45)	30,68±1,60 (28,00)*	63,22±9,74 (54,00)*#	115,91±31,13 (71,85)*##**	47,03±7,61 (36,50)*##** [◊]	52,05±8,71 (56,15)*#
Билирубин общий, мкмоль/л	13,91±1,53 (13,35)	18,31±1,26 (15,70)	16,45±1,87 (13,45)	20,63±3,48 (17,30)	31,83±5,47 (26,70)*##** [◊]	75,05±20,10 (60,10)*##** ^{◊,Δ}
Билирубин прямой, мкмоль/л	5,45±1,88 (6,01)	8,44±1,80 (7,75)	7,51±1,30 (7,42)	9,02±3,37 (7,26)	21,21±4,61 (19,00)*##** [◊]	59,99±19,14 (53,65)*##** ^{◊,Δ}
ЩФ, Ед/л	138,75±19,21 (132,11)	195,53±10,34 (192,00)*	204,43±11,52 (208,00)*#	256,80±38,01 (210,00)*#	254,26±27,20 (220,50)*#	460,77±101,20 (305,40)*##**
Альбумин, г/л	43,30±2,37 (45,05)	38,81±2,63 (40,25)	41,17±0,91 (41,80)	45,26±4,08 (39,70)	39,21±1,92 (36,40)*	30,72±3,43 (29,85)*##** ^{◊,Δ}
γ-Глобулин, г/л	10,14±0,69 (10,02)	12,62±0,72 (12,12)	12,05±1,40 (12,16)	18,70±3,37 (17,63)*##**	17,40±2,60 (16,40)*	17,89±3,40 (19,05)*##**
СРБ, мг/л	1,53±1,53 (0,00)	2,65±1,83 (0,74)*	2,11±0,98 (0,57)*	6,34±3,21 (2,64)*	11,00±2,27 (10,56)*##** [◊]	17,98±5,81 (18,95)*##** ^{◊,Δ}
Протромбин, %	88,14±6,53 (86,25)	85,15±3,67 (83,72)	96,57±3,11 (88,82)	101,50±13,42 (90,67)	79,17±3,94 (79,00)*##** [◊]	58,00±5,45 (53,10)*##** ^{◊,Δ}
Фибриноген, г/л	3,60±0,36 (3,35)	2,86±0,25 (2,60)*	2,72±0,21 (2,71)*	2,63±0,24 (2,61)*	3,02±0,14 (2,56)*	2,17±0,13 (2,15)*
ОХС, ммоль/л	5,34±0,25 (5,41)	5,94±0,15 (5,90)*	6,30±0,37 (6,22)*#	6,07±0,30 (6,19)*	5,17±0,44 (5,35) [◊]	4,07±0,51 (3,75)*##** ^{◊,Δ}
ЛПВП, ммоль/л	1,66±0,19 (1,37)	1,29±0,07 (1,22)*	1,22±0,09 (1,08)*	1,10±0,13 (0,98)*	1,27±0,19 (1,10)*	0,75±0,18 (0,95)*##** ^{◊,Δ}
ЛПНП, ммоль/л	3,74±0,37 (3,64)	3,70±0,15 (3,88)	4,28±0,27 (4,28)*#	4,41±0,25 (4,56)*#	3,68±0,47 (3,70) [◊]	2,43±0,40 (2,32)*##** ^{◊,Δ}
ТГ, ммоль/л	1,46±0,13 (1,32)	2,56±0,45 (1,84)*	2,82±0,77 (1,96)*	2,32±0,27 (2,11)*	1,20±0,16 (1,21) [◊]	1,02±0,13 (0,98)*##** [◊]

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$. В скобках – медиана. АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспаргатаминотрансфераза, ЩФ – щелочная фосфатаза, СРБ – С-реактивный белок, ОХС – общий холестерин, ЛПВП – липопротеины высокой плотности, ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ТГ – триглицериды. Достоверные различия ($p < 0,05$ согласно критерию *U* Вилкоксона–Манна–Уитни) по сравнению: * – с контрольной группой, # – с группой НАСГ-СА, ** – с группой НАСГ-УА, [◊] – с группой НАСГ-ВА, ^Δ – с группой ЦП-А.

Диагноз с оценкой степени активности НАСГ и класса ЦП устанавливался на основании традиционных клинических, лабораторных, инструментальных и гистологических данных. Выполнялось ультразвуковое исследование органов брюшной полости (аппарат Vivid Pro-7, General Electric, США) с оценкой эхогенности и размеров печени, размеров селезенки, наличия асцита, при доплерографии определялись диаметры воротной и селезеночной вен и линейная скорость кровотока в них для выявления портальной гипертензии. При эзофагогастроскопии оценивалось наличие варикозного расширения вен пищевода и кардиального отдела желудка. Части больных выполнялась спиральная компьютерная томография печени с оценкой плотности печени и слепая чрескожная пункционная биопсия печени с оценкой степени активности и фиброза по методу Brunt [7]. Тяжесть цирроза рассчитывалась с помощью классификации Чайлд–Пью [8, 9]. Доноры включены в исследование на основании информированного согласия. Критерии исключения, общие для изучаемых групп: перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, беременность и лактация, курение, сахарный диабет, индекс массы тела ≥ 30 кг/м². У обследованных лиц

исключен вирусный, лекарственный и аутоиммунный генез поражения печени, сахарный диабет 1-го и 2-го типа. Все доноры являлись жителями Республики Карелия. На проведение исследований получено согласие Комитета по медицинской этике Министерства здравоохранения Республики Карелия и Петрозаводского государственного университета.

В качестве материала для исследования использовали образцы венозной крови доноров изучаемых групп. Взятие материала для исследования проводилось до назначения гепатопротекторной и иной терапии. Оценивались печеночные функциональные пробы: активность АЛТ, АСТ, уровень общего и прямого билирубина, ЩФ, альбумина, γ-глобулина, СРБ, протромбина, фибриногена, ОХС, ЛПВП, ЛПНП, ТГ – на анализаторе Random Access F-15 (BioSystems, Испания).

Концентрацию цитокинов и содержание ТПС (фрагменты цитокератина 18) в крови определяли методом неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем «Интерлейкин-1бета-ИФА-Бест», «Интерлейкин-6-ИФА-Бест», «Интерлейкин-10-ИФА-Бест» («Вектор-Бест», Россия), Human TNFα Platinum

Таблица 2. Содержание цитокинов в плазме крови и уровень экспрессии генов *TNF* и *IL6* в ЛПК у пациентов с НАЖБП и у доноров контрольной группы

Показатель	Контроль	НАСГ-СА	НАСГ-УА	НАСГ-ВА	ЦП-А	ЦП-В
Уровень экспрессии гена <i>TNF</i> в ЛПК, отн. ед.	17,730±8,162 (10,351)	19,778±6,063 (12,988)	20,507±8,634 (12,342)	32,029±9,599 (28,057)*,*,**	11,531±3,918 (8,583) [°]	18,370±8,507 (10,411) [°]
Уровень экспрессии гена <i>IL6</i> в ЛПК, отн. ед.	0,100±0,053 (0,021)	0,070±0,029 (0,027)	0,035±0,010 (0,027)	0,045±0,023 (0,025)	0,060±0,029 (0,025)	0,049±0,029 (0,015)
Концентрация ФНО-α в крови, пг/мл	4,62±0,57 (4,96)	6,59±0,45 (6,35)*	6,34±0,39 (6,78)*	6,91±0,38 (7,00)*	5,59±0,60 (5,65)*	5,95±0,49 (6,59)*
Концентрация ИЛ-6 в крови, пг/мл	2,61±0,54 (2,79)	7,28±3,17 (6,05)*	5,53±1,12 (3,40)*	7,34±2,91 (5,65)*	23,78±5,52 (15,57)*,*,**,°	53,13±12,16 (38,68)*,*,**,°Δ
Концентрация ИЛ-10 в крови, пг/мл	7,72±1,04 (7,40)	17,97±3,05 (15,60)*	16,73±2,96 (16,60)*	13,90±1,84 (15,97)*	11,14±1,07 (13,20)*	25,60±7,86 (16,00)*
Концентрация ИЛ-1β в крови, пг/мл	3,67±0,63 (2,41)	5,14±1,80 (2,59)	4,85±1,58 (3,33)	2,91±0,47 (3,41)	5,02±0,85 (4,97)*,°	5,94±0,74 (5,15)*,*,**,°

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$. В скобках – медиана. Достоверные различия ($p < 0,05$ согласно критерию *U* Вилкоксона–Манна–Уитни) по сравнению: * – с контрольной группой, # – с группой НАСГ-СА, ** – с группой НАСГ-УА, ° – с группой НАСГ-ВА, Δ – с группой ЦП-А.

ELISA (eBioscience, Австрия), TPS (ТПС) ELISA (Biotech, Швеция) на анализаторе Sunrise (Tecan, Швейцария).

Для определения уровня транскрипции генов *TNF*, *IL6* и генов каспаз из цельной крови выделяли лейкоциты периферической крови (ЛПК). 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 транскрипции генов в ЛПК оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad, США), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Евроген», Россия). Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Повторность при ПЦР-анализе – 2-кратная. Уровень транскрипции изучаемых генов рассчитан относительно уровня транскрипции гена *GAPDH* [10]. Описание праймеров для генов *GAPDH*, каспаз 3, 8, 9 в ЛПК представлено в работе [6]. Последовательность праймеров для генов *TNF* и *IL6* указана в работах [11, 12].

Активность каспаз 3, 8 и 9 в ЛПК определяли с использованием наборов Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric (содержащий субстрат каспазы 3 N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilide), Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric (содержащий субстрат каспазы 8 N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroaniline) и субстрата каспазы 9 N-Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-p-Nitroanilide фирмы Sigma, в соответствии с инструкциями производителя. Активность ферментов определяли колориметрическим методом по скорости расщепления синтетического субстрата на планшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech GmbH, Германия). Активность каспаз выражали в наномолях р-нитроанилина (р-NA), образующегося за 1 мин, в расчете на 1 мл пробы (при условии, что 100 мкл лизирующего буфера содержит 10^7 живых клеток).

Статистическая обработка материала проведена с использованием программного обеспечения StatGraphics 2.1 (Statistical Graphics Corp., США). Проводили тест на соответствие результатов нормальному распределению. Для оценки различий биохимических и других показателей в группах исследования использовали непараметрический критерий *U* Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

У пациентов по мере прогрессирования НАСГ наблюдается повышение маркеров цитолитического и холестатического синдромов – АЛТ, АСТ, ЩФ. Также у них растет уровень показателей мезенхимально-воспалительного синдрома (СРБ и γ -глобулина), закономерно изменяется липидный спектр (см. табл. 1). При ЦП активность АЛТ и АСТ снижена по сравнению с таковой при НАСГ-УА и -ВА и нарастает от класса А к классу В ЦП, а уровень ЩФ достоверно выше у ЦП-А по сравнению с НАСГ-СА и у ЦП-В по сравнению с НАСГ-СА и -УА. При ЦП по сравнению с НАСГ и прогрессивно классу ЦП значимо возрастает концентрация общего и прямого билирубина и снижается уровень протромбина. У больных ЦП также значительно повышен уровень СРБ, который достигает максимума у пациентов с ЦП класса В, уровень γ -глобулина сопоставим с таковым у пациентов с НАСГ-ВА. По мере прогрессирования ЦП (от класса А к классу В) значительно снижается уровень альбумина в крови. О глубоких нарушениях липидного обмена свидетельствует снижение уровней всех основных фракций липидов у пациентов ЦП класса В (см. табл. 1).

Анализ содержания цитокинов в плазме крови и уровня транскрипции генов основных провоспалительных цитокинов *TNF* и *IL6* в ЛПК показал, что концентрация ИЛ-6 при НАСГ и ЦП достоверно выше, чем в контроле, при этом содержание данного цитокина в крови значительно выше у пациентов с ЦП, по сравнению с НАСГ, и нарастает прогрессивно классу ЦП, достигая максимального значения при ЦП-В (табл. 2). В то же время уровень экспрессии гена *IL6* в ЛПК не различается у доноров изучаемых групп. При ЦП также повышен уровень ИЛ-1β по сравнению с контролем; у пациентов с ЦП класса В содержание ИЛ-1β в крови достоверно выше, чем у пациентов с НАСГ любой степени активности. Содержание ФНО-α и ИЛ-10 у пациентов с НАЖБП повышено по сравнению с контролем и не различается в зависимости от формы НАЖБП. Нужно отметить, что оценка уровня экспрессии генов *TNF* и *IL6* в ЛПК в зависимости от формы НАЖБП проведена впервые. Показано, что пациенты с НАСГ-ВА имеют повышенный уровень экспрессии гена *TNF* в ЛПК по сравнению с контролем, НАСГ-СА и -УА и по сравнению с ЦП классов А и В (см. табл. 2).

Несмотря на отсутствие достоверных различий уровней экспрессии генов каспаз в ЛПК у пациентов с НАСГ

разных степеней активности, в результате анализа биохимических и молекулярно-генетических показателей апоптоза гепатоцитов и периферических лейкоцитов в ряде случаев выявлено снижение уровня их экспрессии у больных НАСГ по сравнению с контролем. При НАСГ всех степеней активности уровень экспрессии гена каспазы 3 ниже, чем в контроле. Уровень экспрессии гена каспазы 8 в ЛПК при НАСГ-СА достоверно ниже, чем в контроле, уровни транскрипции гена каспазы 9 при НАСГ-СА и НАСГ-ВА также ниже, чем в контроле. При ЦП экспрессия генов каспаз в ЛПК находится на уровне контроля, за исключением уровня транскрипции гена каспазы 3 при ЦП-А и каспазы 9 – при ЦП-В (данные показатели ниже, чем в контроле; табл. 3).

Впервые проведен анализ активности основных каспаз в ЛПК при прогрессировании НАЖБП (см. табл. 3). Показано, что активность каспаз 3, 8 и 9 в ЛПК пациентов с НАСГ всех степеней активности и ЦП классов А и В выше, чем в контроле. При этом наблюдаются достоверные отличия уровня активности каспаз у пациентов с ЦП по сравнению с НАСГ. Так, активность эффекторной каспазы 3 при ЦП выше, чем при НАСГ-СА. Активность каспазы 8 снижена при ЦП относительно НАСГ-УА и -ВА, а активность каспазы 9 при ЦП значительно выше, чем при НАСГ любой степени активности (см. табл. 3).

Обсуждение

В связи со сложностью механизмов патогенеза НАЖБП и особой актуальностью проблемы прогрессирования НАЖБП в ЦП после тщательного отбора пациентов, которым на момент забора материала не назначена гепатопротекторная и иная терапия, проведен сравнительный анализ целого комплекса клинико-лабораторных, биохимических и молекулярно-генетических показателей повреждения печени, воспаления (в том числе экспрессии в ЛПК генов основных провоспалительных цитокинов, отвечающих за воспаление при прогрессировании НАЖБП), апоптоза (ТПС как показателя апоптоза гепатоцитов, активности каспаз и экспрессии кодирующих генов в ЛПК).

В целом, нами зарегистрированы специфические изменения клинической картины при прогрессировании НАСГ и ЦП. При ЦП изменения клинических показателей свиде-

тельствуют о развитии печеночно-клеточной недостаточности вследствие уменьшения массы паренхиматозной ткани, нарушении белкового и липидного обменов, прогрессирующем воспалении.

В результате анализа содержания цитокинов в плазме крови и уровня транскрипции генов основных провоспалительных цитокинов *TNF* и *IL6* в ЛПК получены интересные новые данные, свидетельствующие о достоверных отличиях уровня экспрессии гена *TNF* в ЛПК у пациентов с НАСГ высокой активности от такового у здоровых людей и пациентов с НАСГ-СА, -УА и ЦП. Высокий уровень экспрессии гена *TNF* в ЛПК у пациентов НАСГ-ВА позволяет рассматривать этот показатель как новый диагностический маркер НАСГ-ВА. Изменение цитокинового профиля при прогрессировании НАСГ и ЦП подтверждает ключевую роль провоспалительных цитокинов как медиаторов воспалительного процесса при прогрессировании НАЖБП [13].

В настоящее время возрастает количество работ, в которых наряду с цитокинами в качестве перспективных маркеров прогрессирования НАЖБП рассматриваются показатели апоптоза. При этом проблема роли апоптоза как одной из форм программируемой гибели клеток в прогрессировании НАЖБП остается малоизученной [14]. В связи с этим проведен сравнительный анализ биохимических и молекулярно-генетических показателей апоптоза гепатоцитов (уровня ТПС в крови) и периферических лейкоцитов (активности каспаз и уровня экспрессии генов каспаз). ТПС представляет собой фрагмент промежуточных филаментов цитоскелета клетки, которые нарезаются эффекторной каспазой 3 при апоптозе гепатоцитов, и служит сывороточным маркером данного явления при НАСГ [15]. Результаты исследования уровня ТПС при НАЖБП неоднозначны, хотя большинство авторов рассматривают его в качестве информативного маркера воспаления и фиброза при прогрессировании данного заболевания [16, 17]. Индукция апоптоза, как известно, опосредуется активацией каспаз – ферментов семейства протеаз, причем увеличение активности эффекторных каспаз, а именно – каспазы 3, как правило, указывает на необратимую деградацию клеток. Так, у пациентов с неалкогольным и алкогольным стеатогепатитами возрастает количество клеток с признаками апоптоза, сопровождаемое увеличением активности каспазы 3 [18]. Следует отметить, что, несмотря на все

Таблица 3. Уровень биохимических и молекулярно-генетических показателей апоптоза у пациентов с НАЖБП и у доноров контрольной группы

Показатель	Контроль	НАСГ-СА	НАСГ-УА	НАСГ-ВА	ЦП-А	ЦП-В
Уровень экспрессии гена каспазы 3 в ЛПК, отн. ед.	0,062±0,011 (0,044)	0,023±0,004 (0,015)*	0,019±0,003 (0,018)*	0,020±0,003 (0,020)*	0,049±0,021 (0,016)*	0,037±0,008 (0,025)
Уровень экспрессии гена каспазы 8 в ЛПК, отн. ед.	0,019±0,008 (0,019)	0,015±0,002 (0,010)*	0,021±0,006 (0,009)	0,019±0,006 (0,013)	0,015±0,008 (0,010)	0,009±0,005 (0,011)
Уровень экспрессии гена каспазы 9 в ЛПК, отн. ед.	0,035±0,004 (0,031)	0,023±0,003 (0,014)*	0,035±0,008 (0,023)	0,025±0,006 (0,015)*	0,051±0,025 (0,020)	0,017±0,004 (0,014)*
Активность каспазы 3 в ЛПК, нмоль рНА/мин/мл	0,884±0,311 (0,560)	1,248±0,246 (0,847)*	1,986±0,584 (1,113)*	1,376±0,353 (1,041)*	1,891±0,290 (1,831)*#	1,903±0,310 (1,850)*#
Активность каспазы 8 в ЛПК, нмоль рНА/мин/мл	1,986±0,303 (1,834)	4,448±0,713 (2,756)*	7,027±2,017 (5,147)*	5,843±1,822 (3,066)*	2,356±0,951 (1,986)*#* ^o	3,113±1,876 (2,514)*#* ^o
Активность каспазы 9 в ЛПК, нмоль рНА/мин/мл	1,405±0,218 (1,522)	4,425±0,660 (3,181)*	3,979±0,854 (2,628)*	4,730±0,956 (3,011)*	9,612±3,633 (9,517)*#* ^o	12,120±3,423 (10,870)*#* ^o
ТПС, Ед/л	93,10±25,19 (140,43)	233,42±42,51 (146,67)	286,81±36,01 (199,91)*#	513,52±158,36 (244,00)*#	310,10±94,23 (290,29)*#	НД

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$. В скобках – медиана. Достоверные отличия ($p < 0,05$ согласно критерию У Вилкоксона–Манна–Уитни) по сравнению: * – с контрольной группой, # – с группой НАСГ-СА, ** – с группой НАСГ-УА, ^o – с группой НАСГ-ВА, ^Δ – с группой ЦП-А. НД – нет данных.

возрастающее количество работ, посвященных изучению вклада каспазо-зависимого апоптоза в патогенез неинфекционных заболеваний печени, роль каспаз в развитии этих патологий до конца не изучена. Кроме того, в литературе мало информации об интенсивности апоптоза периферических лейкоцитов при прогрессировании НАЖБП, в то время как ЛПК являются главными клетками, реализующими иммуновоспалительный процесс в печени и прогрессирование печеночно-клеточной недостаточности. Основная часть данных об экспрессии и изменении активности каспаз получена на гепатоцитах, а не на лейкоцитах периферической крови [19]. Сведения об изменении уровня апоптоза клеток периферической крови при развитии патологий печени малочисленны и касаются в основном заболеваний вирусного и аутоиммунного генеза [20]. В связи с этим актуальным является вопрос изучения показателей апоптоза данных клеток при прогрессировании НАЖБП.

В настоящем исследовании не зарегистрировано достоверных различий уровней экспрессии генов каспаз в ЛПК у пациентов изучаемых групп, в связи с чем эти показатели нельзя считать специфичными для оценки прогрессирования НАЖБП. Данные анализа активности основных каспаз в периферических лейкоцитах при прогрессировании НАЖБП являются абсолютно новыми. Показано, что активность каспаз 3, 8 и 9 в ЛПК пациентов с НАСГ всех степеней активности и ЦП классов А и В выше, чем в контроле. Нужно отметить, что регуляция функционирования каспаз может осуществляться не только на уровне транскрипции. Так, итоговая каспазная активность в каждом конкретном типе тканей определяется не только уровнем транскриптов генов каспаз, но и наличием или отсутствием ингибиторов апоптоза [21, 22]. Также полученные нами результаты могут свидетельствовать о разных механизмах регуляции апоптоза лейкоцитов и гепатоцитов. Зарегистрированные достоверные отличия уровней активности каспаз у пациентов с ЦП по сравнению с НАСГ свидетельствуют о том, что при прогрессировании НАЖБП в ЦП в периферических лейкоцитах имеет место усиление процессов апоптоза, запускаемых по внутреннему митохондриальному пути, и снижение активности апоптоза, активируемого через «рецепторы смерти». Что касается данных об уровне ТПС в крови, они согласуются с данными литературы об усилении процессов апоптоза гепатоцитов при НАСГ [23].

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Adams LA, Ratzliff V. Non-alcoholic fatty liver – perhaps not so benign. *J Hepatol.* 2015;62(5):1002-4. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.005
- Liu B, Balkwill A, Reeves G, Beral V; Million Women Study Collaborators. Body mass index and risk of liver cirrhosis in middle aged UK women: prospective study. *BMJ.* 2010;340:c912. doi: 10.1136/bmj.c912
- Ивашкин В.Т., Маевская М.В. Лечение осложнений цирроза печени: методические рекомендации для врачей. М.: Литтерра; 2011 [Ivashkin VT, Maevskaya MV. *Lechenie oslozhnenii tsirroza pecheni: metodicheskie rekomendatsii dlya vrachei* [Treatment of liver cirrhosis complications: methodical recommendations for doctors]. Moscow: Litterra; 2011 (In Russ.)].
- Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Павлов Ч.С., Федосина Е.А., Бессонова Е.Н., Пирогова И.Ю., Гарбузенко Д.В. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации по лечению осложнений цирроза печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2016;26(4):71-102 [Ivashkin VT, Maevskaya MV, Pavlov ChS, Fedosina YeA, Bessonova YeN, Pirogova IYu, Garbuzenko DV. Treatment of liver cirrhosis complications: Clinical guidelines of the Russian Scientific Liver Society and Russian gastroenterological association. *Rossiiskii Zhurnal Gastroenterologii, Gepatologii, Koloproktologii = The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2016;26(4):71-102 (In Russ.)]. doi: 10.22416/1382-4376-2016-4-71-102
- Дуданова О.П., Шиповская А.А., Курбатова И.В., Ларина Н.А. Неалкогольная жировая болезнь печени: патогенез, клинические проявления, методы диагностики и лечения. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ; 2017 [Dudanova OP, Shipovskaya AA, Kurbatova IV, Larina NA. *Nealkogol'naya zhirovaya bolezni' pecheni: patogenez, klinicheskie proyavleniya, metody diagnostiki i lecheniya* [Non-alcoholic fatty liver disease: pathogenesis, clinical manifestations, methods of diagnosis and treatment]. Petrozavodsk: Publishing house of PetrSU; 2017 (In Russ.)].
- Курбатова И.В., Дуданова О.П. Особенности некротически-воспалительного процесса при разных формах неалкогольной жировой болезни печени. *Терапевтический архив.* 2017;89(2):52-8 [Kurbatova IV, Dudanova OP. Features of a necrotic and inflammatory process in different forms of nonalcoholic fatty liver disease. *Ther Arch.* 2017;89(2):52-8 (In Russ.)]. doi: 10.17116/terarkh201789252-58

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что при неалкогольном ЦП как исходе прогрессирования НАСГ изменения клинических показателей (свидетельствующие о развитии печеночно-клеточной недостаточности, нарушении белкового и липидного обмена, прогрессирующем воспалении) сопровождаются специфическими изменениями уровней биохимических и молекулярно-генетических показателей апоптоза и воспаления. При прогрессировании НАСГ в ЦП изменяется цитокиновый профиль за счет повышения уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-1 β . По сравнению с ЦП, у пациентов с НАСГ-ВА отмечается высокий уровень экспрессии гена *TNF* в ЛПК, который также значительно выше такового у здоровых людей и пациентов с НАСГ-СА, -УА. Данный факт позволяет рассматривать этот показатель как новый диагностический маркер разграничения НАСГ-ВА и ЦП. При прогрессировании НАЖБП в ЦП в ЛПК имеют место усиление процессов апоптоза, запускаемых по внутреннему (митохондриальному) пути, и снижение активности апоптоза, активируемого по внешнему пути (через «рецепторы смерти»). Увеличение активности каспазы 9 и снижение активности каспазы 8 в ЛПК у пациентов с ЦП, по сравнению с НАСГ, можно рассматривать в качестве перспективного малоинвазивного маркера прогрессирования НАЖБП в ЦП.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221–2017–0049). Работа выполнена также при финансовой поддержке программы развития опорного университета ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» на период 2017–2021 годов – проекта «Высокие биомедицинские технологии здоровьесбережения населения в арктической и субарктической зонах», проекта «Разработка технологии скрининговой диагностики неалкогольной жировой болезни печени у лиц с избыточным весом и метаболическим синдромом» № 9173ГУ/2015.

7. Brunt EM, Janney CG, Diisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(9):2467-74. doi: 10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x
8. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg.* 1964;1:1-85.
9. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Brit J Surg.* 1973;60(8):646-9. doi: 10.1002/bjs.1800600817
10. 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):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
11. Pinto JP, Dias V, Zoller H, Porto G, Carmo H, Carvalho F, de Sousa M. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology.* 2010;130(2):217-30. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x
12. Wang F, Xu L, Feng X, Guo D, Tan W, Zhang M. Interleukin-29 modulates proinflammatory cytokine production in synovial inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(5):R228. doi: 10.1186/ar4067
13. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18(8):727-35. doi: 10.3748/wjg.v18.i8.727
14. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2014;28(11):607-18. doi: 10.1155/2014/757929
15. Yilmaz Y. Systematic review: caspasecleaved fragments of cytokeratin 18 (the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease). *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;30(11-12):1103-9. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.04148.x
16. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(4):643-54. doi: 10.1016/j.cgh.2014.04.014
17. Kawanaka M, Nishino K, Nakamura J, Urata N, Oka T, Goto D, Suehiro M, Kawamoto H, Yamada G. Correlation between serum cytokeratin-18 and the progression or regression of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2015;14(6):837-44. doi: 10.5604/16652681.1171767
18. 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. *Amer J Gastroenterol.* 2004;99(9):1708-17. doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.40009.x
19. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Semin Liver Dis.* 2010;30(4):402-10. doi: 10.1055/s-0030-1267540
20. Буеверов А.О., Киселева О.Ю., Ивашкин В.Т., Белушкина Н.Н., Москалева Е.Ю., Широкова Е.Н., Маевская М.В. Сравнительная характеристика апоптоза периферических лейкоцитов при вирусных и аутоиммунных заболеваниях печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2009;(4):41-7 [Bueverov AO, Kiseleva OYu, Ivashkin VT, Belushkina NN, Moskalova YeYu, Shirokova YeN, Maevskaja MV. Comparative characteristic of apoptosis of peripheral leukocytes at viral and autoimmune liver diseases. *Rossiiskii Zhurnal Gastroenterologii, Hepatologii, Koloproktologii = The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2009;(4):41-7 (In Russ.)].
21. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* 2002;9(3):459-70. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00482-3
22. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-6. doi: 10.1038/35037710
23. Jayakumar S, Harrison SA, Loomba R. Noninvasive markers of fibrosis and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Hepatol Rep.* 2016;15(2):86-95. doi: 10.1007/s11901-016-0296-8

Поступила 16.08.2018