

Значение иммуновоспалительных и генетических факторов в развитии алкогольного фиброза печени

А.С. Иванов¹, И.В. Гармаш¹, О.С. Аришева¹, Н.Н. Теребилина²,
В.Ю. Баронец², Д.И. Перегуд², Ж.Д. Кобалава¹

¹Медицинский институт
ФГАОУ ВО "Российский
университет дружбы
народов" 117198,
Москва, РФ,

²ФГБУ "Национальный
медицинский исследова-
тельский центр психиат-
рии и наркологии имени
В.П. Сербского" (филиал
ФГБУ НИИЦ ПН МЗ РФ
имени В.П. Сербского)
МЗ РФ, Москва, РФ

Для корреспонденции:
А.С. Иванов. Кафедра
внутренних болезней с
курсом кардиологии и
функциональной диагно-
стики имени академика
В.С. Моисеева, РУДН,
Москва, 17292,
Вавилова, 61.
aleks_iv90@mail.ru

Для цитирования:
Иванов А.С., Гармаш
И.В., Аришева О.С. и др.
Значение иммуно-
воспалительных и генети-
ческих факторов в разви-
тии алкогольного
фиброза печени.
Клин фармакол тер
2018;27(5):30-35.
DOI 10.32756/0869-
5490-2018-5-30-35.

Цель. Изучить иммуновоспалительные и гене-
тические факторы, участвующие в развитии
фиброза печени у пациентов, злоупотребляю-
щих алкоголем.

Материал и методы. В исследование были
включены 46 пациентов (средний возраст
50,2±11,5 лет, 35 мужчин) с алкогольной
болезнью печени (АБП), распределенных на
группы в зависимости от степени фиброза
печени, которую определяли методом непрямой
эластометрии: 1-я – F0+1 (n=20), 2-я –
F3+4 (n=36). У всех больных измеряли кон-
центрации интерлейкина (ИЛ)-6, ИЛ-8, фактора
некроза опухоли (ФНО)- α , VEGF-A, sICAM-1,
эндотелина (ЭТ)-1 и полиморфизм генов
ФНО- α (*rs1800629*), ИЛ-6 (*rs1800795*),
VEGF-A (*rs699947*), ICAM-1 (*rs281437*),
ЭТ-1 (*rs1800541*), ИЛ-8 (*rs4073*).

Результаты. У пациентов с АБП concentra-
ции ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , VEGF-A, sICAM-1
были выше референтных значений. Уровни
ИЛ-6, ИЛ-8, sICAM-1 и ЭТ-1 зависели от степе-
ни алкогольного фиброза печени и во 2-й груп-
пе были выше, чем в 1-й ($p < 0,05$). Плотность
печени достоверно ($p < 0,05$) коррелировала с
уровнем ИЛ-6 ($r = 0,6$), ИЛ-8 ($r = 0,77$), sICAM-1
($r = 0,58$), ЭТ-1 ($r = 0,56$). Различий частоты аллел-
ей и генотипов исследуемых генов между
группами не выявлено ($p > 0,05$). В обеих груп-
пах у пациентов с генотипом CA *rs699947*
C2578A уровень VEGF-A был выше, чем у
пациентов с генотипом AA ($p = 0,04$ и $p = 0,01$,
соответственно). У пациентов 2-й группы geno-
тип TT *rs281437 -451C > T* ассоциировался с
более высоким уровнем sICAM-1 по сравнению
с таковым у пациентов с генотипом CC
($p = 0,05$).

Заключение. Прогрессирование фиброза
печени сопровождается изменением интерлей-
кинового профиля и маркеров эндотелиальной
дисфункции, которые прямо связаны с плот-
ностью печени.

Ключевые слова. Фиброз печени,
алкогольная болезнь печени, цитокины,
эндотелиальная дисфункция, генетический
полиморфизм.

В настоящее время около 80% случаев
цирроза печени в индустриальных
странах прямо или косвенно обуслов-
лены алкоголем. Употребление алкогольных
напитков, эквивалентное 40-80 г этанола в
сутки, на протяжении 10-12 лет приводит к
развитию алкогольной болезни печени
(АБП) [1], которая включает в себя стеатоз,
стеатогепатит, цирроз и гепатоцеллюлярную
карциному. Почти все клинические формы
АБП сопровождаются развитием фиброза
печени в результате персистирующего вос-
паления, индуцированного этанолом. В
ответ на воздействие алкоголя и его метабо-
литов высвобождается целый каскад цитоки-
нов, запускающих процессы воспаления,
фиброгенеза и фибролиза, что приводит к
избыточному накоплению внеклеточного
коллагена [2]. К основным цитокинам, уча-
ствующим в ремоделировании внеклеточно-
го матрикса, относятся интерлейкин-6
(ИЛ-6), ИЛ-8 и фактор некроза опухоли- α
(ФНО- α). Они выделяются после употребле-
ния алкоголя и стимулируют образование
острофазных белков гепатоцитами, увели-
чивают экспрессию провоспалительных
цитокинов в макрофагах [3,4], вызывают
нейтрофилию и инфильтрацию нейтрофила-
ми печени [5,6].

Ремоделирование ткани печени в процес-
се воспаления и фиброза сопровождается
портальной гипертензией, в основе которой
лежит внутри- и внепеченочная дисфункция
эндотелия [7,8]. Надежным маркером повре-
ждения эндотелия считают растворимую
молекулу межклеточной адгезии (sICAM-1),
эндотелин-1 (ЭТ-1), сосудистый эндотели-
альный фактор роста-A (VEGF-A). Эти фак-
торы, вероятно, участвуют в изменении
внутрипеченочной микроциркуляции и
ангиогенезе при гипоксии и воспалении
[9,10]. В табл. 1 представлены маркеры вос-
паления, эндотелиальной дисфункции (ЭД)
и гены, участвующие в иммуновоспалитель-
ных изменениях при фиброзе печени.

В последнее время большое значение

ТАБЛИЦА 1. Медиаторы воспаления и эндотелиальной дисфункции

Маркер	Функции	Ген
ИЛ-6	Один из важнейших медиаторов острой фазы воспаления. Высвобождается после употребления алкоголя. Стимулирует дифференцировку В- и Т-клеток, образование антител, выработку острофазных белков гепатоцитами, увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов в макрофагах и уменьшает некроз-ассоциированное воспаление в гепатоцитах за счет предотвращения гибели эндотелиальных клеток синусоидных сосудов и улучшения микроциркуляции [4,20]	Ген ИЛ-6 расположен на хромосоме 7p21. Полиморфизм <i>rs1800795</i> ассоциирован с уровнем ИЛ-6 [18,19]
ИЛ-8	Провоспалительный хемокин подсемейства СХС, который синтезируется макрофагами, эпителиальными, эндотелиальными клетками, гепатоцитами. Вызывает хемотаксис нейтрофилов и инфильтрацию ими печени [20].	Ген ИЛ-8 расположен в коротком плече 4 хромосомы. Полиморфизм <i>rs4073</i> ассоциирован с АБП [21]
ФНО- α	Медиатор воспаления, пролиферации клеток и апоптоза. Участвует в развитии воспалительной реакции при остром и хроническом гепатите. Способствует экспрессии других цитокинов и молекул адгезии, которые опосредуют активацию иммунных клеток, участвующих в гибели гепатоцитов [23]	Ген ФНО- α расположен на хромосоме 6p21.3 внутри главного комплекса гистосовместимости. Полиморфизм <i>rs1800629</i> ассоциирован с тяжестью различных заболеваний печени [22]
ICAM-1	Трансмембранный белок типа I, который экспрессируется на синусоидальных эндотелиальных клетках в печени, способствует миграции нейтрофилов и моноцитов, ассоциирован с тяжестью заболевания печени [24,25]	Ген ICAM-1 расположен на хромосоме 19 p13.2-p13.3. Полиморфизм <i>rs281437</i> ассоциирован с фиброзом печени [25,26]
ЭТ-1	Оказывает вазоконстрикторное и митогенное действие, положительное инотропное и хронотропное действие, стимулирует симпатическую и ренин-ангиотензин-альдостероновую системы и модифицирует гомеостаз. Уровень повышается при заболеваниях печени [27]	Ген ЭТ-1 состоит из 6836 нуклеотидов, расположенных на хромосоме 6p23-p24. Полиморфизм <i>rs1800541</i> у пациентов с АБП не изучался [28]
VEGF-A	Эндогенный митоген и индуктор ангиогенеза. Экспрессируется в эндотелиальных клетках, гепатоцитах, звездчатых клетках. Способствует ангиогенезу и прогрессированию фиброза печени [30]	Ген VEGF расположен на хромосоме 6p21.3. Полиморфизм <i>rs699947</i> при заболеваниях печени не изучали [28,29]

придается изучению генетических факторов, влияющих на цитокиновый профиль и концентрации маркеров эндотелиальной дисфункции, у пациентов с АБП [10,11]. В отдельных работах определяли частоту полиморфизма различных генов цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции при алкоголизме и АБП [12-15]. Однако работ, посвященных изучению связи концентраций маркеров с аллельными вариантами полиморфных локусов их генов, недостаточно [16,17].

Целью исследования было изучение иммуновоспалительных и генетических факторов, участвующих в развитии фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем.

Материалы и методы

В исследование включали пациентов с алкогольной болезнью печени, проходивших лечение в ГКБ №64 г. Москвы или наблюдающихся амбулаторно в Национальном научном центре наркологии г. Москвы (филиал ФГБУ НИИЦ ПН МЗ РФ им. В.П. Сербского). Исследование одобрено этическим комитетом при ФГАОУ ВО России - ский университет дружбы народов (№21 от 21.04.2017).

Критериями хронической алкогольной интоксикации служили признание злоупотребления алкоголем самим пациентом и/или его родственниками, а также позитивные ответы на опросники CAGE и AUDIT [31,32]. Из исследования исключали пациентов с антителами к вирусам гепатита, пациентов с хроническими заболеваниями печени неалкогольной этиологии, острым алкогольным гепатитом, повышением активности аминотрансфераз более чем 5 раз по сравнению с верхней границей нормы [32].

Стадию фиброза печени (F) определяли методом непрямой эластометрии с помощью аппарата "Фиброскан" (Франция): F0 – плотность 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 [36].

Содержание маркеров эндотелиальной дисфункции и цитокинов определяли через 7 дней после поступления в

стационар на фоне гарантированной абстиненции в лаборатории биохимии Национального научного центра наркологии. Содержание ИЛ-6, VEGF-A, sICAM-1 и ФНО α в сыворотке крови измеряли с помощью коммерческих ИФА-наборов Bender MedSystems (Австрия), ИЛ-8 – Invitrogen (США), ЭТ-1 – Biomedica (Австрия). В качестве референсных значений использовали концентрации маркеров, измеренные у 15 здоровых доноров, согласно рекомендациям производителей.

Из цельной крови выделяли тотальную ДНК на колонках с помощью набора реагентов "К-Сорб" (#EX-514, Синтол, Россия). Аллельные варианты полиморфных локусов определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, используя термоциклер АНК-48 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Использовали наборы реактивов для определения одонуклеотидных полиморфизмов ФНО- α (*rs1800629*), ИЛ-6 (*rs1800795*), VEGF-A (*rs699947*) ("SNP-Скрин" #NP-465-100, NP-512-100, NP-454-100 и NP-453-100, соответственно, Синтол, Россия) и ICAM-1 (*rs281437*), ЭТ-1 (*rs1800541*), ИЛ-8 (*rs4073*) (#4351379, Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Statistica (8.0 для Win dows). С учетом малого размера выборки и проведенных тестов (критерии Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка, ящичная гистограмма) большинство показателей считали распределенными ненормально. Статистическую достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили с помощью метода Спирмена. Для сравнения частоты аллелей и генотипов исследуемых признаков использовали таблицы сопряженности и критерий χ^2 с поправкой Йейтса при ожидаемых частотах более 10 и точный критерий Фишера при ожидаемых частотах менее 10. Расчет количественной оценки влияния непрерывных и дискретных факторов на бинарный параметр проводился с помощью логистического регрессионного анализа с расчетом отношения шансов (ОШ). Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 2. Сравнительная характеристика двух групп пациентов (n=46)

Показатель	1-я группа (n=10)	2-я группа (n=36)
Возраст, лет	48,9±13,4	51,3±11,1
Мужчины, n (%)	7 (70,0)	28 (77,8)
Степень фиброза (F), n (%)		
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	4,5 [3,1;5,5]	60,5 [15,4;75,0]*
Индекс массы тела, кг/м ²	31,1±7,9	26,1±4,4
Употребление алкоголя (лет)	18,5±9,4	15,5±9,6
Число полож. ответов по тесту CAGE	3,2±0,7	3,5±0,5
Число полож. ответов по тесту AUDIT	20,8±5,7	22,6±4,0
Желтуха, n (%)	0	12 (34,3)
Диаметр воротной вены, мм	11,0 [11;12]	13,0 [12;14]*
Асцит, n %	0	26 (72,2)
Смерть, (n)%	0	3 (8,3)

Примечание: *p<0,01 между группами (U-критерий Манна-Уитни)

Результаты

В исследование были включены 46 пациентов с АБП (средний возраст 50,2±11,5 лет, 35 мужчин), злоупотребляющих алкоголем в течение в среднем 15,6±9,6 лет. Пациенты были распределены на группы с низкой (F0+F1) и высокой (F3+F4) степенью фиброза печени. Больных с F2 выявлено не было. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, индексу массы тела и алкогольному анамнезу (табл. 2). У пациентов с более выраженным фиброзом печени отмечались желтуха и асцит, были выше уровни С-реактивного белка (СРБ), билирубина и ниже МНО, протромбиновый индекс, уровни альбумина и активность холинэстеразы (табл. 3)

Уровни цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции. Концентрации ИЛ-6 и ИЛ-8 превышали референсные значения у пациентов обеих групп и во 2-й группе были достоверно выше, чем в 1-й группе. Выявлена прямая корреляция между содержанием ИЛ-6 и ИЛ-8 и плотностью печени, которую измеряли с помощью эластометрии. Концентрация ФНО- α была выше референсных значений у пациентов обеих групп, однако она достоверно не отличалась между группами и не коррелировала с плотностью печени (табл. 4).

Уровни VEGF-A и sICAM-1 в обеих группах превышали референсные значения. Концентрация sICAM у пациентов 2-й группы была достоверно выше, чем в 1-й группе, и прямо коррелировала с плотностью печени, в то время как достоверных отличий уровней VEGF-A между двумя группами не выявили. Уровень ЭТ-1 был повышен только у пациентов с выраженным фиброзом, однако его концентрация ассоциировалась с плотностью печени (табл. 4).

Генетические детерминанты иммунновоспалительных реакций и фиброгенеза. Аллельные варианты полиморфных локусов были определены у 43 из 46 пациентов, в том числе у всех 10 больных 1-й группы и 33 из 36 пациентов 2-й группы. Достоверной разницы в распре-

делении генотипов и/или накоплении аллелей генов, кодирующих ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , VEGF-A, ICAM-1, ЭТ-1, между двумя группами не выявлено (табл. 5). Ассоциация между аллельными вариантами полиморфных локусов генов ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , ЭТ-1 и концентрацией маркеров также отсутствовала. В то же время как в 1-й, так и 2-й группе концентрация VEGF-A у пациентов с генотипом СА локуса rs699947 2578C>A была достоверно выше, чем у пациентов с генотипом АА (1-я группа: 2100,7 [1129,0-3346] и 316,0 [267,4-364,6] пг/мл, соответственно; p=0,04; 2-я группа: 1360,0 [747,4-1698,0] и 364,0 [267,4-412,6] пг/мл; p=0,01). У гомозигот по аллелю А концентрация VEGF-A в обеих группах были ниже, чем у гетерозигот. Кроме того, во 2-й группе генотип ТТ локуса ICAM-1 rs281437 -451C>T ассоциировался с более высоким уровнем sICAM-1 по сравнению таковым у больных с генотипом СС (1686,0 [1672-1700] и 987,2 [303-1726] пг/мл, соответственно; p=0,05) (табл. 5).

Обсуждение

Таким образом, у пациентов с АБП были повышены концентрации всех исследованных цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции. Содержание ИЛ-6, ИЛ-8, sICAM-1 и ЭТ-1 зависело от стадии фиброза печени и в большей степени увеличивалось при тяжелом фиброзе (F3-4). В предыдущих исследованиях концентрации ИЛ-6 и ИЛ-8 увеличивались у пациентов с АБП, у которых отсутствовали клинические признаки заболевания [20], и/или нарастали по мере прогрессирования поражения печени [35]. В нашем исследовании также выявлена корреляция между содержанием ИЛ-6 и ИЛ-8 и плотностью печени. Провоспалительный цитокин ИЛ-8 ранее изучался у пациентов с различны-

ТАБЛИЦА 3. Лабораторные показатели у пациентов двух групп (n=46)

Показатель	1-я группа (n=10)	2-я группа (n=36)
Гемоглобин, г/л	145,0 [122,0;160,0]	110,0 [94,0;128,5]**
Лейкоциты, тыс/мкл	7,8 [7,2;8,7]	6,9 [5,2;8,7]
Тромбоциты, тыс/мкл	188,0 [134,0;334,0]	168,0 [139,0;253,0]
СОЭ, мм/ч	15,0 [12,0;35,0]	34,5 [10,0;49,0]
С-реактивный белок, мг/л	2,1 [2,0;2,1]	13,4 [9,4;46,0]*
АЛТ, Ед/л	31,2 [18,0;74,0]	30,4 [17,1;58,8]
АСТ, Ед/л	39,0 [22,5;58,1]	71,1 [39,6;152,5]
Гамма-ГТ, Ед/л	57,0 [39;105]	274,0 [104;409]**
Билирубин, мкмоль/л		
общий	11,2 [9,1;23,4]	51,0 [15,4;162,4]*
прямой	2,9 [1,8;8,3]	27,7 [6,0;88,4]*
Щелочная фосфатаза, Е/л	89,0 [50,5;372,5]	165,0 [112,3;203,0]
Общий белок, г/л	75,0 [57,9;77,1]	68,3 [58,4;75]
Альбумин, г/л	38,9 [38,4;40,0]	24,4 [22,2;32,3]**
Холестерин, ммоль/л	4,6 [3,1;5,0]	3,9 [2,9;4,9]
Холинэстераза, Ед/л	5,5 [4,1;6,1]	2,35 [1,9;3,5]*
Протромб. индекс, %	92,5 [77,0;100]	58,0 [38,5;77,5]*
МНО, МЕ/мл	1,1 [1,0;1,2]	1,6 [1,2;1,9]*
Креатинин, мкмоль/л	84,5 [77,0;107,0]	77,0 [60,0;103,0]
Мочевина, ммоль/л	5,8 [5,3;7,3]	4,2 [2,6;6,2]
Фолиевая кислота, нг/мл	4,9 [4,8;6,0]	4,3 [3,4;5,3]

Примечание: *p<0,05, **p<0,01 между группами (U-критерий Манна-Уитни)

ТАБЛИЦА 4. Уровни медиаторов воспаления и маркеров эндотелиальной дисфункции у пациентов двух групп (n=46)

Показатели	Референсные значения	1-я группа (n=10)	2-я группа (n=36)	r (p<0,05)
ИЛ-6, пг/мл	0,5±0,2	2,4 [1,2;2,8]	13,0 [3,1;26,0]*	0,60
ИЛ-8, пг/мл	0,4±0,3	1,6 [0,0;5,9]	30,7 [12,4;80,5]*	0,77
ФНО-α, пг/мл	0,10±0,06	0,22 [0,22;0,24]	0,27 [0,22;0,29]	-
VEGF-A, пг/мл	273,6±38,0	746,8 [354,2;1827,2]	996,4 [428,6;1572,4]	-
sICAM-1, нг/мл	311±27	469 [288;645]	1120 [621;1569]*	0,58
ЭТ-1, фмоль/мл	1,2±0,2	0,0 [0;0,2]	1,5 [0,5;2,8]*	0,56

Примечание: *p<0,05 между двумя группами (U-критерий Манн-Уитни). r – коэф. корреляции Спирмана с плотностью печени (p<0,05)

ми заболеваниями печени, в частности при алкогольном гепатите наблюдалось значительное повышение его уровня, а при циррозе печени – умеренное повышение [23,36]. В другом исследовании у 90 пациентов, злоупотребляющих алкоголем, концентрация ИЛ-8 была выше, чем у здоровых добровольцев (n=15), причем повышение содержания цитокина не зависело от тяжести поражения печени [35]. В нашем исследовании значительное повышение уровня ИЛ-8 наблюдалось только у пациентов с выраженным фиброзом печени.

Повышение уровня ФНО-α в сыворотке ранее было описано у пациентов с АБП [38]. ФНО-α вызывает активацию различных цитокинов, способствуя прогрессированию фиброза печени, а концентрация его при циррозе печени, в том числе компенсированном и декомпенсированном, выше, чем у здоровых людей [20]. При острой декомпенсации печеночной функции отмечалась обратная корреляция содержания ФНО-α с тяжестью заболевания печени [38]. Наши результаты частично согласуются с данными литературы. У пациентов с АБП мы выявили повышение уровня ФНО-α по сравнению с референсными значениями, однако при прогрессировании фиброза печени достоверного увеличения концентрации цитокина не отмечено.

Маркеры эндотелиальной дисфункции у пациентов с заболеваниями печени изучены в меньшей степени, чем цитокины. Концентрация их в сыворотке повышалась при длительном употреблении алкоголя [39], остром алкогольном гепатите и циррозе печени [40]. В нашем исследовании значительное увеличение содержания sICAM-1 наблюдалось только у больных с тяжелым фиброзом печени (F3-4).

Повышение уровня VEGF-A отмечено при злоупотреблении алкоголем и различных стадиях заболевания печени [41,42]. Наши результаты согласуются с данными литературы,

свидетельствующими о том, что концентрация VEGF-A не зависит от стадии фиброза печени.

Содержание ЭТ-1 также повышалось у пациентов с АБП и коррелировало с прогрессированием фиброза и портальной гипертензией [43]. В нашем исследовании повышение уровней ЭТ-1 отмечалось при тяжелом фиброзе печени и коррелировало с плотностью печени. Прямая корреляция маркеров воспаления (ИЛ-6, ИЛ-8)

ТАБЛИЦА 5. Генетические детерминанты иммуновоспалительных реакций и фиброгенеза

Генотипы	1-я группа (n=10)		2-я группа (n=33)	
	n (%)	Уровень маркера	n (%)	Уровень маркера
ИЛ-6				
<i>rs1800795 C174G</i>				
CG	10 (100)	2,6 [2,1-2,8]	20 (64,5)	11,2 [3,4-26,0]
CC	0	-	7 (22,6)	11,6 [2,4-34,4]
GG	0	-	4 (12,9)	8,0 [1,9-13,6]
C	10 (50,0)	2,6 [2,1-2,8]	34 (54,8)	11,5 [2,7-26,0]
G	10 (50,0)	2,6 [2,1-2,8]	28 (45,2)	9,8 [2,0-14,6]
ИЛ-8				
<i>rs4073 -352A/T</i>				
AT	8 (80)	4,4 [1,5-7,5]	18 (56,3)	39,4 [5,3-69,1]
TT	2 (20)	0,0	9 (28,1)	20,7 [12,4-228,8]
AA	0	-	5 (15,6)	14,1 [8,8-294,1]
T	12 (60,0)	4,4 [1,5-7,5]	36 (56,0)	28,5 [8,9-161,3]
A	8 (40,0)	4,4 [1,5-7,5]	28 (43,7)	23,4 [8,1-175,3]
ФНО-α				
<i>rs1800629 4682G/A</i>				
GA	3 (20,0)	0,21 [0,19-0,23]	6 (18,8)	0,29 [0,2-0,38]
GG	6 (60,0)	0,22 [0,21-0,23]	26 (81,2)	0,26 [0,21-0,29]
AA	1 (20,0)	0,0	0	-
G	15 (83,3)	0,22 [0,20-0,23]	58 (90,6)	0,25 [0,20-0,31]
A	5 (16,7)	0,21 [0,19-0,23]	6 (9,4)	0,29 [0,20-0,38]
VEGF-A				
<i>rs699947 C2578A</i>				
CA	6 (60,0)	2100,7 [1129,0-3346,0]*	15 (46,9)	1360,0 [747,4-1698,0]*
AA	4 (40,0)	316,0 [267,4-364,6]*	8 (25,0)	364,0 [267,4-412,6]*
CC	0	-	9 (28,1)	914,2 [429,3-1426,8]
C	6 (30,0)	2100,7 [1129,0-3346,0]	33 (51,6)	1118,1 [667,2-1611,2]
A	14 (70,0)	1461,5 [967,6-2649,2]	31 (48,4)	960,5 [747,1-1488,0]
ICAM-1				
<i>rs281437 -451C>T</i>				
CT	4 (40,0)	428,7 [212,0-645,0]	10 (31,3)	1242,7 [621,0-1569,0]
CC	6 (60,0)	408,7 [288,0-521,0]	20 (62,5)	987,2 [560,0-1544,0]*
TT	0	-	2 (6,2)	1686,0 [1672,0-1700,0]*
C	16 (80,0)	412,4 [244,0-361,2]	50 (78,1)	1087,2 [560,0-1544,0]
T	4 (20,0)	428,7 [212,0-645,0]	14 (21,9)	1287,4 [961,5-1664,1]
ЭТ-1				
<i>rs1800541 -1644T>G</i>				
TG	6 (60,0)	0,4 [0,0-1,1]	9 (28,1)	1,9 [0,7-2,8]
TT	4 (40,0)	0,1 [0,0-0,2]	23 (71,9)	1,5 [0,0-2,7]
GG	0	-	0	-
G	6 (30,0)	0,36 [0,0-1,1]	9 (28,1)	1,9 [0,7-2,8]
T	14 (70,0)	0,16 [0,0-0,9]	55 (71,9)	1,5 [0,4-2,7]

Примечание: *p<0,05 внутри группы. Уровни ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α и VEGF-A приведены в пг/мл, sICAM-1 – в нг/мл, ЭТ-1 – в фмоль/мл

и эндотелиальной дисфункции (sICAM-1, ЭТ-1) с плотностью печени, выявленная в нашем исследовании, соответствует данным других авторов [20,36,40,43].

В литературе описана ассоциация аллеля Т локуса *rs281437 -451C>T* гена ICAM-1 с тяжестью фиброза и прогрессированием фиброза печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С [24,44,45]. В нашем исследовании генотип ТТ ассоциировался с более высокими уровнями sICAM-1 в группе пациентов с АБП и выраженным фиброзом печени. Однако частота аллелей и генотипов не отличалась между двумя группами пациентов. Локус *rs699947 2578C>A* гена VEGF-A ранее изучали у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, болезнями почек и кожи. Были выявлены ассоциации экспрессии локуса с более высокими уровнями VEGF-A [46-48]. В нашем исследовании генотип СА ассоциировался с более высоким уровнем VEGF-A по сравнению с таковым при генотипе АА у пациентов как с выраженным, так и незначительным фиброзом печени. При этом у гомозигот по аллелю А концентрации VEGF-A в обеих группах были ниже, чем у гетерозигот.

Локус *rs1800795 174C>G* гена ИЛ-6 изучали у пациентов с неалкогольными заболеваниями печени и АБП. Ассоциации между аллелем С и генотипами по аллелю С с риском развития неалкогольной жировой болезни печени наблюдали у пациентов в российской и других популяциях [49,50], а также на фоне носительства вируса гепатита С [14], в то время как с АБП в разных исследованиях связей не обнаружено [51,52]. В нашем исследовании не было выявлено достоверной разницы уровней ИЛ-6 у носителей различных генотипов и аллелей, а частота их была сопоставимой у пациентов с низкой и высокой степенью фиброза печени.

Локус *rs4073 -352A/T* гена ИЛ-8 у пациентов с заболеваниями печени ранее не изучался. В нашем исследовании достоверных ассоциаций вариантов аллелей и генотипов с уровнем ИЛ-8 и их различий по частоте между двумя группами обнаружено не было.

Установлено, что гомозиготность по аллелю G локуса *rs1800629* гена ФНО- α и и однонуклеотидная последовательность *4682 G/A* у пациентов с вирусным гепатитом и циррозом печени ассоциируется с повышенными уровнями ФНО- α и тяжестью заболевания [53-55]. По нашим данным, у пациентов с АБП ассоциаций с уровнем ФНО- α и различий по частоте аллелей и генотипов между пациентами с легким и выраженным фиброзом печени не выявлено.

У пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и сахарным диабетом полиморфизм гена ЭТ-1 *rs1800541 -1644T>G* ассоциировался с риском развития и тяжестью заболевания [56,57]. В нашем исследовании связи полиморфизма *rs1800541 -1644T>G* с уровнем ЭТ-1 выявлено не было, а частота генотипов и аллелей не отличалась у пациентов с различной выраженностью фиброза печени.

Заключение

У пациентов с АБП отмечено повышение уровней мар-

керов воспаления и эндотелиальной дисфункции, особенно при наличии выраженного фиброза печени. Выявлена прямая корреляционная связь уровней провоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ИЛ-8) и маркеров эндотелиальной дисфункции (ЭТ-1, sICAM-1) с выраженностью фиброза печени. Носительство генотипа СА локуса *rs699947 2578A* гена VEGF-A ассоциировалось с высоким уровнем VEGF-A в крови у пациентов с АБП, а генотип ТТ локуса *rs281437 -451C/T* гена ICAM-1 у пациентов с выраженным фиброзом печени сопровождался повышением уровней sICAM-1.

Конфликт интересов: нет.

1. Rehm J, Taylor B, Mohapatra S, Irving H, et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Send to Drug Alcohol Rev.* 2010; 29(4):437-45.
2. Rey JW, Noetel A, Hardt A et al. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 in patients with fatty liver diseases. *World J Gastroenterol* 2010;16(46):5830-37.
3. Панченко Л.Ф., Тербилина Н.Н., Пирожков С.В. и др. Иммуноклеточные маркеры фиброза у больных с алкогольными заболеваниями печени. *Наркология* 2016;6:54-61. [Panchenko LF, Terbilina NN, Pirozhkov SV et al. Immune cell markers of fibrosis in patients with alcoholic liver diseases. *Nar ko - logiya* 2016;6:54-61 (in Russ.)].
4. Nicoloua C, Chatzipanagiotou S, Tzivosa D. Serum cytokine concentrations in alcohol-dependent individuals without liver disease. *Alcohol* 2004;32:243-7.
5. Циммерман Я.С. Фиброз печени: патогенез, методы диагностики, перспективы лечения. *Клин фармакол тер* 2017;26(1):54-8. [Tsimmerman YaS. Liver fibrosis: pathogenesis, diagnostic methods, treatment prospects. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya = Clin Pharmacol Ther* 2017;26(1):54-8 (in Russ.)].
6. Губергриц Н.Б. Фиброз печени. Основы практической гепатологии 2015:29-320. [Gubergrits NB. Liver fibrosis. *Osnovy prakticheskoy gepatologii* 2015:29-320 (in Russ.)].
7. Bosch J, Abraldes JG, Fernández M, García-Pagán JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53:558-67.
8. 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.
9. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem.* 2013;153(1):13-9.
10. Vadlamani L, Iyengar S. Tumor necrosis factor α polymorphism in heart failure/cardiomyopathy. *Congestive Heart failure* 2004;10(6):289-92.
11. Tiret L, Mallet C, Poirier O. et al. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy: the CARDIGENE study. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:29-35.
12. Pastor IL. -238 G>A polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene (TNFA) is associated with alcoholic liver cirrhosis in alcoholic Spanish men. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29(11):1928-31.
13. Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D. et al. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013;19(16):2449-55.
14. Marcos M, Pastor I, González-Sarmiento R, Laso FJ. Common polymorphisms in interleukin genes (IL4, IL6, IL8 and IL12) are not associated with alcoholic liver disease or alcoholism in Spanish men. *Cytokine* 2009;45:158-61.
15. Nurdjanah S, Sadewa AH, Hakimi M. The role of vascular endothelial growth factor -634 G/C and its soluble receptor on chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Arab J Gastroenterol* 2016;17(2):61-6.
16. Marcos M, Gómez-Munuera MJ, Pastor I, et al. Tumor necrosis factor polymorphisms and alcoholic liver disease: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2009;170:948-56.
17. Giannitrapani L, Soresi M, Giacalone A. et al. IL-6 -174G/C polymorphism and IL-6 serum levels in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *OMICS* 2011;15:183-6.
18. Bowcock AM, Kidd JR, Lathrop GM et al. The human "interferon-beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics* 1988;3:8-16.
19. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-76.
20. Nagy LE. The role of innate immunity in alcoholic liver disease. *Alcohol Res* 2015;37(2):237-50.
21. Borekci G, Karakas Celik S, Kandemir O. Investigation of IL-1 beta, IL-1 receptor antagonist and IL-8 gene polymorphisms in patients with chronic hepatitis B and C. *Mikrobiol Bul* 2014;48(2):271-82.
22. 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.
23. Kawaratan H, Tsujimoto T, Douhara A. et al. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Med Inflamm* 2013;3:495156.
24. Lawson Ch, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharm Reports* 2009;61:22-32.

25. Rizk N M, 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.
26. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411–5.
27. Ahmed M, Rghigh A. Polymorphism in endothelin-1 gene: an overview. *Curr Clin Pharmacol* 2016;11(3):191–210.
28. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493–5.
29. Bagyura Z, Kiss L, Hirschberg K. Association between VEGF gene polymorphisms and in-stent restenosis after coronary intervention treated with bare metal stent. *Disease Markers* 2017;1–7.
30. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem* 2013;153(1):13–9.
31. Гармаш И.В. Алкогольная болезнь печени. В кн. Моисеев В.С. Алкогольная болезнь. Поражение внутренних органов. М., ГЭОТАР-Медиа; 104–15 [Garmash IV. Alcoholic liver disease. In: Moiseev VS. *Alkohol'naya bolezn'*. Porazhenie vnutrennih organov. M., GEHOTAR-Media; 104–115 (in Russ)].
32. EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease. *J Hepatol* 2012;57:399–420.
33. Ledinghen V, Vergnol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroenterol Clin Bio* 2008;32:58–67.
34. Pavlov CS, Casazza G, Nikolova D. et al. Transient elastography for diagnosis of stages of hepatic fibrosis and cirrhosis in people with alcoholic liver disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2015.
35. Балашова А.А., Аришева О.С., Гармаш И.В. и др. Цитокины и алкогольная болезнь печени. *Клин фармакол тер* 2017;26(1):41–6 [Balashova AA, Arisheva OS, Garmash IV et al. Cytokines and alcoholic liver disease. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya* = *Clin Pharmacol Ther* 2017;26(1):41–6 (in Russ)].
36. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunol* 2007;8(9): 942–9.
37. McClain CJ, Barve S, Barve S et al. Tumor necrosis factor and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22(5):248–52.
38. Dirchwolf M, Podhorzer A, Marino M. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. *Cytokine* 2016;77:14–25.
39. Sacanella E, Estruch R. The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. *Addict Biol* 2003;8(4):371–8.
40. Mándi Y, Nagy I, Krenács L. Relevance of ICAM-1 to alcoholic liver cirrhosis. *Pathobiology* 1996;64(1):46–52.
41. Bosio D, Salvi V, Gagliostro V, Sozzani S. Angiogenic and antiangiogenic chemokines. *Chem Immunol Allergy* 2014;99:89–104.
42. Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis* 2010;30:258–70.
43. 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.
44. Ohlinger W, Dinges HP, Zatlouk K. Immunohistochemical detection of tumor necrosis factor- α , other cytokines and adhesion molecules in human livers with alcoholic hepatitis. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1993;423:169–76.
45. Дудина К.Р., Царук К.А., Шут'ко С.А. и др. Ассоциация полиморфизма гена ICAM-1 с прогрессирующим течением гепатита С. *Лечащий врач* 2013. <https://www.lvrach.ru/2014/12/15436125/> [Dudina KR, Caruk K A, Shut'ko SA et al. Association of the polymorphism of the gene ICAM-1 with a progressive course of hepatitis C. *Lechashchij vrach* 2013. <https://www.lvrach.ru/2014/12/15436125/> (In Russ)].
46. Giordano FJ, Gerber HP, Williams SP. et al. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(10):5780–5.
47. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003;34(4):383–94.
48. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(1):260–4.
49. Kurbatova, IV, Topchieva LV, Dudanova OP. Caspase 3, 6, 8, and 9 gene expression in peripheral blood leukocytes and plasma concentrations of IL-6 and TNF- α in carriers of different polymorphic marker -174G>C genotypes of IL6 gene associated with the risk of nonalcoholic steatohepatitis. *Bull Exper Biol Med* 2017;162(3):370–4.
50. Cengiz M, Yasar D, Ergun M, et al. The role of interleukin-6 and interleukin-8 gene polymorphisms in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepat Mon* 2014;14: e24635.
51. Motawi T, Shaker OG, Hussein RM, Houssen M. Polymorphisms of α 1-antitrypsin and interleukin-6 genes and the progression of hepatic cirrhosis in patients with a hepatitis C virus infection. *Balkan J Med Genet* 2016;19(2):35–44.
52. Reichert S, Schlitt A, Benten AC, et al. Data on IL-6 c.-174 G>C genotype and allele frequencies in patients with coronary heart disease in dependence of cardiovascular outcome. *Data Brief* 2016;8:1295–9.
53. Булатова И.А., Шекотова А.П., Шекотов В.В. и др. Роль фактора некроза опухоли альфа и полиморфизма гена TNFA в локусе G4682A в прогрессировании хронического гепатита С. *Вектор-Бест* 2015;3(77):5–10 [Bulatova IA, Shchyokotova AP, Shchyokotov VV, et al. The role of tumor necrosis factor alpha and TNFA gene polymorphism in the G4682A locus in the progression of chronic hepatitis C. *Vektor-Best* 2015;3(77):5–10 (In Russ)].
54. Ion DA, Radulescu M, Aram \check{a} V et al. Inflammatory patterns in patients with chronic hepatitis C. *BMC Infect Dis* 2013;13(1):032.
55. Булатова И.А., Шекотова А.П., Долгих О.В. и др. Диагностическое значение фактора некроза опухоли-альфа и полиморфизма его гена (G4682A) в прогрессировании цирроза печени. *Пермский медицинский журнал* 2016;50-54 [Bulatova IA, Shchyokotova AP, Shchyokotov VV et al. The diagnostic value of tumor necrosis factor-alpha and its gene polymorphism (G4682A) in the progression of liver cirrhosis. *Permskij medicinskij zhurnal* 2016:50-54 (In Russ.)].
56. Abman SH. Role of endothelin receptor antagonists in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Annu Rev Med* 2009;60:13–23.
57. Zhu G, Carlsen K, Carlsen KH et al. Polymorphisms in the endothelin-1 (EDN1) are associated with asthma in two populations. *Genes Immun* 2008;9(1):23–9.

Immune-inflammatory and genetic factors in the development of alcoholic liver fibrosis

A.S. Ivanov¹, I.V. Garmasch¹, O.S. Arisheva¹, N.N. Terebilina², V.Yu. Baronets², D.I. Pereguč², Zh.D. Kobalava²

¹ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

² Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Aim. To evaluate the role of immune-inflammatory and genetic factors in the development of liver fibrosis in patients with alcohol liver disease (ALD).

Material and methods. Forty-six patients with ALD (35 males, mean age 50.2±11.5 years) were enrolled in our study and were distributed into two groups depending on the stage of liver fibrosis, that was determined by transient elastometry (F0+1, n=10; F3+4, n=36). We measured serum interleukin (IL)-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- α , VEGF-A, sICAM-1, ET-1 levels and gene polymorphism of TNF- α (*rs1800629*), IL-6 (*rs1800795*), VEGF-A (*rs699947*), ICAM-1 (*rs281437*), ET-1 (*rs1800541*), IL-8 (*rs4073*).

Results. Serum IL-6, IL-8, TNF- α , VEGF-A, sICAM-1 levels in patients with ALD were higher than the reference values. Serum IL-6, IL-8, sICAM-1 and ET-1 levels depended on the degree of alcoholic liver fibrosis. Degree of liver fibrosis significantly correlated with IL-6 ($r = 0.60$), IL-8 ($r = 0.77$), sICAM-1 ($r = 0.58$) and ET-1 ($r = 0.56$). There were no significant differences in the TNF- α and VEGF-A levels between the two groups. Different alleles and genotypes of the studied genes occurred with similar frequency in the two groups. In both groups, VEGF-A level in patients with genotypes CA of the *rs699947 C2578A* gene was higher than in patients with genotype AA ($p = 0.04$ and $p = 0.01$). In advanced fibrosis, genotype TT of the *rs281437 -451CT* gene was associated with a higher sICAM-1 compared with genotype CC ($p=0.05$)

Conclusion. Patients with ALD presented with increased levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8) and molecules of endothelial dysfunction (ET1, sICAM-1). Genotype CA of the *rs699947* gene was associated with a higher serum VEGF-A level in patients with ALD, while sICAM-1 level was increased in patients with genotype TT of the *rs281437* gene and severe liver fibrosis.

Keywords. Liver fibrosis, alcoholic liver disease, cytokines, endothelial dysfunction, genetic polymorphism.

Correspondence to: A. Ivanov, MD. Department of Internal Diseases, Peoples' Friendship University of Russia. Vavilova, 61, Moscow, 117292, Russia. aleks_iv90@mail.ru

Conflict of interest: none declared.

To cite: Ivanov AS, Garmasch IV, Arisheva OS, et al. Immune-inflammatory and genetic factors in the development of alcoholic liver fibrosis. *Clin Pharmacol Ther* 2018;27(5):30-35. DOI 10.32756/0869-5490-2018-5-30-35.