

*На правах рукописи*

**ИВАНОВ АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ**

**ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
АЛКОГОЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ**

14.01.04 – внутренние болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Москва

2019

Работа выполнена на кафедре внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики имени академика В.С. Моисеева Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Кобалава Жанна Давидовна**

**Научный консультант:**

кандидат медицинских наук, доцент

**Гармаш Ирина Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный врач Российской Федерации, заведующий кафедрой госпитальной терапии № 2 лечебного факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», директор Федерального государственного автономного учреждения «Лечебно-реабилитационный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Никитин Игорь Геннадиевич**

доктор медицинских наук, профессор, доцент кафедры терапии, профессиональных болезней и ревматологии ГОУ ВПО «Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова»

**Абдурахманов Джамал Тинович**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « 31 » октября 2019 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.004 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117292, г. Москва, ул. Вавилова, д. 61, ГБУЗ ГКБ им. В.В. Виноградова ДЗМ)

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

ПДС 0300.004

кандидат медицинских наук, доцент

**Шаваров А.А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Алкогольная болезнь печени (АБП) — это группа заболеваний, включающая несколько вариантов повреждения печени вследствие злоупотребления алкоголем от стеатоза до алкогольного гепатита (АГ), приводящего к развитию цирроза печени (ЦП) [Маев И.В., Абдурахманов Д.Т., 2014]. Среднесуточное употребление алкогольных напитков в эквиваленте 40-80 г этанола на протяжении 10-12 лет может приводить к алкогольной болезни печени [Ивашкин В.Т., 2017; EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease, 2018]. Алкогольное поражение печени и его осложнения остаются одной из самых частых причин смерти в Европе и США среди заболеваний печени [Tilg, H., 2008]. По данным ВОЗ, около 80% всех случаев ЦП вызвано именно алкоголем [WHO., 2014].

В ответ на воздействие этанола в печени развивается воспаление, характеризующееся выбросом иммуновоспалительных молекул, роль которых в патогенезе АБП до конца не определена. К основным иммуновоспалительным факторам, опосредованных алкоголем относятся изменения цитокинового профиля, дисфункция печеночного эндотелия, а также их генетические аспекты.

Среди цитокинов при инициации алкоголь-индуцированного воспаления наиболее важное значение отводится провоспалительным интерлейкинам (ИЛ)-6 и -8 (Никитан И.Г., 2012). Данные цитокины участвуют в иммунных реакциях, острофазном ответе и регуляции равновесия между про- и противовоспалительными цитокинами. ИЛ-6 активирует перисинусоидальные липоциты, синтез коллагена и его отложение в межклеточном пространстве [Nagy L.E., 2015]. ИЛ-8 (хемокин) опосредует привлечение нейтрофилов в очаг воспаления, что приводит к нейтрофильной инфильтрации печени [Swiatkowska-Stodulska R., 2006].

Дисфункция эндотелия печеночных сосудов, опосредованная алкоголем, сопровождается повышением уровня молекул белковой природы, участвующих в функционировании эндотелия, — васкулоэндотелиальный фактор роста А (VEGF-A), молекулы межклеточной адгезии 1 (s-ICAM-1) и эндотелин-1 (EDN-1) [Петухов В.А., 2008]. Данные полипептиды участвуют в регуляции роста сосудов, в регуляции тонуса печеночных синусоидов и адгезии лейкоцитов.

Установлено, что АБП сопровождается повышением уровней ИЛ-6 и ИЛ-8, VEGF-A, s-ICAM-1 и EDN-1 в сыворотке крови [Моисеев В. С., Балашова А.А. 2017]. Однако механизмы, лежащие в основе данного процесса, остаются малоизученными. Среди возможных причин повышения цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции (ЭД) при АБП можно выделить полиморфизмов промоторных локусов их генов.

### Степень разработанности темы.

В большинстве исследований была продемонстрирована связь между АБП и концентрациями провоспалительных цитокинов. Высокие уровни ИЛ-6, ИЛ-8 наблюдались у пациентов с алкогольным циррозом [Ishikawa, 2010.]. Предполагалось, что определенная концентрация ИЛ-6 может использоваться с целью выделения пациентов с декомпенсированным циррозом [Zuwaag-Jagieo, 2011]. В других исследованиях концентрации ИЛ-6 и ИЛ-8 повышались у пациентов со стеатогепатитом [Nagy L.E., 2015] и увеличивались по мере прогрессирования алкогольного фиброза печени [Моисеев В. С., Балашова А.А., 2017]. Значительное повышение уровня ИЛ-8 наблюдалось при АГ [Latvala J., 2005, Zago P., 2016], что послужило основанием выделения ИЛ-8 как маркера данного варианта АБП. Повышенные концентрации интерлейкинов ассоциировались с алкоголизмом, при этом, повышение уровня не зависело от тяжести поражения печени [Hideto Kawaratani, 2013].

Работы, посвященные изучению роли маркеров ЭД в развитии АБП не многочисленны. В основном изучались больные с ЦП у которых были продемонстрированы высокие

концентрации VEGF-A, s-ICAM-1 и EDN-1 в плазме крови по сравнению со здоровыми лицами [Li CP., 2003; Adams D.H. 1994; Mándi Y., 1996; Alam I., 2000;]. Имеются отдельные данные о связи сывороточной концентрации маркеров ЭД с хронической алкогольной интоксикацией и алкоголизмом без соматической патологии [Heberlein A., 2010].

В большинстве исследований выявлялись разнонаправленные корреляционные связи между уровнями интерлейкинов и маркеров ЭД с клинико-лабораторными характеристиками алкогольного ЦП. В тоже время в отдельных работах, посвященных АГ отсутствовали ассоциации между иммуновоспалительными факторами и поражением печени в независимости от тяжести заболевания [Огурцов П.П., Журавлева А., 2014]. Зачастую, в качестве группы сравнения выступали здоровые добровольцы, пациенты с не алкогольными заболеваниями печени. Как правило иммуновоспалительные механизмы изучались в зависимости от нозологической формы АБП (стеатоз, АГ, ЦП) без учета причины декомпенсации печеночной недостаточности. Известно, что наряду с низкой приверженностью к лечению, инфекциями и кровотечением основной причиной декомпенсации стабильной АБП является алкогольный эксцесс [Fuster D., 2018], клиническим проявлением которого считается АГ, характеризующийся высоким уровнем провоспалительных цитокинов [Kawaratani H., 2013; González-Reimers E., 2012; Ishikawa M., 2010]. В тоже время, абстиненция приводит к постепенному снижению уровней иммуновоспалительных маркеров [Li W., 2017]. Данные о роли алкоголя в острой декомпенсации печеночной недостаточности на фоне АБП в изменении уровня цитокинов и маркеров ЭД отсутствуют.

В настоящее время остается открытым вопрос о влиянии промоторных областей генов цитокинов и маркеров ЭД на уровень соответствующих молекул на фоне АБП.

Однонуклеотидные замены в промоторном участке гена могут изменять транскрипционную активность конкретного гена, что может лежать в основе изменения уровня белкового продукта. Среди разнообразия однонуклеотидных замен в промоторных участках генов наибольший интерес представляют локусы rs1800795 174C>G *ИЛ-6*, rs4073 -352A>Т *ИЛ-8*, rs281437 -451C>Т *ICAM-1*, rs699947 2578C>А и rs2010963 -634G>С *VEGF-A* и rs1800541 -1644Т>G *EDN-1*. Идентифицированы два фенотипа полиморфизма rs1800795 174C>G *ИЛ-6*: фенотип с высоким уровнем продуцирования, включая генотипы 174 G/G и 174 C/G, характеризующиеся более высокими уровнями циркулирующего ИЛ-6, и фенотип с низким уровнем циркуляции 174 C/C [Noss E.H., 2015 ]. Полиморфизм *ИЛ-8* rs4073 в положении -352 А>Т был открыт в 2014г и на данный момент интенсивно изучается. Носительство аллеля С локуса rs699947 связано с более высоким уровнем продукции VEGF лейкоцитами, стимулированными *in vitro* [Shahbazi M., 2002]. Активность промотора гена *VEGF*, содержащего аллель С локуса rs2010963, значительно выше активности промотора, содержащего аллель G, что было подтверждено на трех клеточных линиях [Chen CF., 2016]. Данные о влиянии локуса rs281437 на содержание s-ICAM1 в циркуляторном русле или активность гена *ICAM1* не удалось найти, однако известно, что указанный локус связан с высоким риском развития фиброза печени при гепатите С [Rizk N.M., 2013]. Уровень мРНК и секретируемого полипептида EDN-1 в первичных культурах клеток остеосаркомы, полученных от носителей гомозиготного генотипа GG локуса rs1800541, был наименьшим по сравнению с носителями генотипов TT и TG [Zang X., 2013].

Известны работы, которые показали связь аллельных вариантов полиморфных локусов, кодирующих молекулы цитокинов и ЭД и развитием вирусного ЦП и гепатоцеллюлярной карциномы [Wu LM., 2009; Marcos M., 2009; Дудина К.Р., 2014; Rizk NM., 2013; Ratnasari N., 2016], однако при заболеваниях печени алкогольной этиологии указанные локусы не изучались.

С учетом данных об участии маркеров ЭД и цитокинов в иммуновоспалительных процессах при алкогольном поражении печени актуальной задачей является исследование их концентраций в зависимости от варианта алкогольного заболевания печени и

генетических факторов, влияющих на концентрации цитокинов и маркеров повреждения эндотелия.

**Цель:** у пациентов с сопоставимой длительностью и уровнем злоупотребления алкоголем, изучить цитокиновый статус, маркеры ЭД и полиморфные локусы промоторных областей их генов в зависимости от варианта поражения печени и причины декомпенсации функции печени.

**Задачи:**

1. Изучить концентрации цитокинов и маркеров ЭД (ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A, s-ICAM-1, EDN-1) у лиц с АБП по сравнению со злоупотребляющими алкоголем лиц без патологии печени.
2. Изучить взаимосвязь уровней интерлейкинов и маркеров ЭД с клинико-лабораторными показателями, плотностью печени при алкогольном поражении печени.
3. Исследовать частоту вариантных аллелей полиморфных локусов генов *ИЛ-6* (rs1800795 174C>G), *ИЛ-8* (rs4073 -352A>T), *ICAM-1* (rs281437 -451C>T), *VEGF-A* (rs699947 2578C>A и rs2010963 -634G>C), *EDN-1* (rs1800541 -1644T>G) у пациентов, злоупотребляющих алкоголем и АБП.
4. Оценить взаимосвязи полиморфных локусов генов *ИЛ-6* (rs1800795 174C>G), *ИЛ-8* (rs4073 -352A>T), *ICAM-1* (rs281437 -451C>T), *VEGF-A* (rs699947 2578C>A и rs2010963 -634G>C), *EDN-1* (rs1800541 -1644T>G) с уровнем соответствующих молекул при алкогольном поражении печени.
5. Изучить цитокиновый профиль, маркеры ЭД и их полиморфные локусы при тяжелом алкогольном поражении печени (декомпенсированный ЦП, тяжелый АГ) в зависимости от причины декомпенсации печеночной недостаточности.

#### **Научная новизна**

Выявлено, что при злоупотреблении алкоголем без поражения печени и при алкогольном гепатите нетяжелого течения уровни ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A и EDN-1 повышены незначительно без достоверной разницы между группами.

Установлено, что декомпенсированное поражение печени – алкогольный ЦП и тяжелый АГ сопровождаются значительным повышением ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A, s-ICAM-1 и EDN-1.

Не выявлено ассоциаций уровней ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A, s-ICAM-1 и EDN-1 с показателями активности воспаления в печени (АСТ, АЛТ, лейкоциты, СОЭ), печеночно-клеточной недостаточности (альбумин, ПИ, холинэстераза, холестерин), желтухи, портальной гипертензии (асцит, ВРВП, спленомегалией), плотности печени у злоупотребляющих алкоголем вне зависимости от варианта поражения печени

Показано, что в популяции лиц, злоупотребляющих алкоголем вариантные аллели полиморфных локусов rs1800795 174C>G гена *ИЛ-6*, rs4073 -352A>T гена *ИЛ-8*, rs281437 -451C>T гена *ICAM-1*, rs699947 2578C>A и rs2010963 -634G>C гена *VEGF-A*, rs1800541 -1644T>G гена *EDN-1* распределены равномерно.

Установлено, что носительство аллеля Т в гомозиготном варианте ТТ локуса rs4073 -352A>T гена *ИЛ-8* ассоциируется с более высокими уровнями ИЛ-8 у пациентов с тяжелым алкогольным гепатитом.

Установлены пороговые уровни показателей независимо ассоциированных с наличием ЦП (ИЛ-6 > 3,2 пг/мл и s-ICAM-1 >614,6 пг/мл), декомпенсированного ЦП (ИЛ-6 > 8,5 пг/мл) и тяжелого АГ (ИЛ-8 > 71,8 пг/мл и общий билирубин >107,4 мкмоль/л).

Впервые изучены цитокины - ИЛ-6, ИЛ-8 и маркеры эндотелиальной дисфункции - VEGF-A, s-ICAM-1 и EDN-1 в зависимости от причины декомпенсации функции печени у пациентов с АБП.

#### **Практическая значимость.**

Нецелесообразно определять уровни цитокинов и маркеров ЭД у злоупотребляющих алкоголем пациентов с целью верификации алкогольного гепатита нетяжелого течения.

У лиц с алкогольной болезнью печени можно оценивать уровни ИЛ-6 и VEGF-A в качестве дополнительных маркеров наличия цирроза печени.

Пациентам с декомпенсацией печеночной недостаточности на фоне АБП следует определять уровень ИЛ-8 и общего билирубина для уточнения алкогольной этиологии декомпенсации.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Злоупотребление алкоголем без патологии печени и наличие алкогольного гепатита нетяжелого течения сопровождается повышением ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A и EDN-1 в несколько раз.
2. Значимое повышение ИЛ-6, ИЛ-8, s-ICAM-1, VEGF-A и EDN1 наблюдается у пациентов с циррозом печени и тяжелым алкогольным гепатитом.
3. При АБП уровни ИЛ-6, ИЛ-8, s-ICAM-1, VEGF-A и EDN-1 не коррелируют с параметрами печеночно-клеточной недостаточности, желтухи, портальной гипертензии, плотности печени и показателями активности воспаления в печени среди лиц.
4. Среди лиц, злоупотребляющих алкоголем, варианты аллели полиморфных локусов rs1800795 174C>G гена *ИЛ-6*, rs4073 -352A>Т гена *ИЛ-8*, rs281437 -451C>Т гена *ICAM-1*, rs699947 2578C>А и rs2010963 -634G>С гена *VEGF-A*, rs1800541 -1644Т>G гена *EDN-1* не ассоциируются с алкогольной болезнью печени.
5. Носительство генотипа ТТ локуса rs4073 -352A>Т гена *ИЛ-8* связан с высокими уровнями ИЛ-8 у пациентов с тяжелым алкогольным гепатитом
6. Установлены пороговые значения молекул независимо ассоциированные с наличием компенсированного цирроза печени: ИЛ-6 > 3,2 пг/мл и VEGF-A >614,6 пг/мл); декомпенсированного цирроза печени- ИЛ-6 > 8,5 пг/мл.
7. Определены пороговые уровни молекул ассоциированные с развитием декомпенсации функции печени на фоне острого алкогольного эксцесса: ИЛ-8 > 71,8 пг/мл и общий билирубин >107,4 мкмоль/л.

#### **Внедрение в практику.**

Результаты исследования внедрены в практическую, научную работы и учебный процесс на кафедре внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им академика В.С. Моисеева, кафедре внутренних болезней, кардиологии и клинической фармакологии факультета повышения квалификации медицинских работников ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», а также в практическую работу терапевтических отделений отделения ГБУЗ ГКБ им В.В. Виноградова ДЗМ (Москва) и наркологического диспансера Национального научного центра наркологии г. Москвы (филиал ФГБУ НМИЦ ПН МЗ РФ имени В.П. Сербского»).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных РУДН и 3 работы в изданиях входящих в базу SCOPUS.

**Апробация работы** проведена на расширенном заседании кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им В.С. Моисеева медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и сотрудников ГБУЗ ГКБ им В.В. Виноградова ДЗМ г. Москвы 28 ноября 2018г. Основные положения диссертации были представлены на 44-й сессии ЦНИИ гастроэнтерологии «Персонализированная медицина в эпоху стандартов» (Москва, 2018), XXIII Международном Конгрессе «Гепатология сегодня» (Москва, 2018), IV всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Москва, 2018), XXXIV Всемирном конгрессе терапевтов (Кейптаун, 2018), 45-й сессии ЦНИИ гастроэнтерологии «Вопросы онкологии в практике гастроэнтеролога» (Москва, 2019).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 112 страницах состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов, выводов и практических рекомендаций. Использован 181 источник литературы, из них 21 отечественных. Работа содержит 25 таблиц и 6 рисунков.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Характеристика пациентов, включенных в исследование**

Обследовано 922 пациента, злоупотребляющих алкоголем, госпитализированных в терапевтическое отделение ГБУЗ «ГКБ им. В.В. Виноградова ДЗМ», либо наблюдавшихся амбулаторно в наркологическом диспансере Национального научного центра наркологии - филиала ФГБУ НМИЦ ПН МЗ РФ имени В.П. Сербского» в период с 2015 по 2018 год.

Критерии включения: возраст старше 18 лет, длительный алкогольный анамнез (положительные ответы на опросники CAGE, AUDIT; систематическое употребление алкоголя более 40-80 г / день, наличие стигм ХАИ, согласие пациента на участие в исследовании).

Критерии исключения: наличие заболеваний печени неалкогольного генеза (первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, аутоиммунный гепатит, болезнь Вильсона-Коновалова, гемохроматоз), вирусных гепатитов В и С, онкологических заболеваний, инфекционных заболеваний, системных заболеваний соединительной ткани, заболеваний сердечно-сосудистой системы, сахарного диабета, ИМТ > 35 кг/м<sup>2</sup>, ВИЧ-инфекции, хронические и острые заболевания почек, заболеваний кожных покровов, беременность, отказ от участия в исследовании)

Критериями АГ нетяжелого течения являлись повышенные уровни ГГТП, АСТ и АЛТ, отсутствие признаков портальной гипертензии по данным УЗИ органов брюшной полости, отсутствие степени фиброза по данным эластометрии печени F4 по METAVIR; показателям индекса Меддрея (Meddrey score) <32 [Ивашкин В.Т., 2017].

Критериями АГ тяжелого течения являлись: впервые в течение 3х месяцев возникшая желтуха после эпизода злоупотребления алкоголем; повышенные уровни АЛТ и АСТ, билирубина, лейкоцитоз, повышение С-РБ и СОЭ, признаки снижения белково-синтетической функции печени (гипоальбуминемия, гипохолестеринемия, снижение ПИ, ХЭ); показателям индекса Меддрея (Meddrey score) >32. [Ивашкин В.Т., 2017].

ЦП диагностировался на основании наличия в анамнезе госпитализаций по поводу алкогольного цирроза печени, портальной гипертензии (спленомегалия, расширение варикозных вен пищевода, асцит, наличие в анамнезе кровотечения из варикозных вен пищевода), снижения белково-синтетической функции печени (гипоальбуминемия, гипохолестеринемия, снижение ПИ, ХЭ), данных эластометрии (F4 по METAVIR).

Компенсированный ЦП ставился пациентам с ≤9 баллов по шкале Child-Turcotte-Pugh (СТР), декомпенсированный ЦП диагностировался при ≥10 баллов по шкале СТР.

### **Методы выявления злоупотребления алкоголем и тяжести поражения печени**

Сбор алкогольного анамнеза (длительность, количество употребляемого алкоголя г/сутки в перерасчете на 96 % этанол) проводился у пациента и/или у родственников. Для оценки наличия ХАИ проводился общий осмотр пациента и лабораторные обследования- клинический анализ крови и биохимический анализ крови (ожирение, дефицит массы тела, тремор, мышечная атрофия, наличие татуировок, контрактура Дюпюитрена, гепатомегалия, телеангиэктазия, пальмарная эритема, следы травм, ожогов, костных переломов, отморожений, повышение ГГТП, (MCV), АСТ/АЛТ >2). Выявленное сочетание 7 и более клинических и лабораторных признаков свидетельствуют о регулярном избыточном употреблении алкоголя [Ивашкин В.Т., 2017; EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease., 2018].

Всем пациентам проводилось анкетирование опросниками AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) и CAGE. Оценка теста CAGE осуществляется следующим

образом: положительные ответы на три вопроса позволяют предполагать систематическое употребление алкоголя; положительные ответы на четыре вопроса указывают на систематическое употребление алкоголя, приближающееся к состоянию зависимости [Ивашкин В.Т., 2017; Винникова М.А., 2013].

Чувствительность тестов CAGE, AUDIT и маркеров ХАИ составляет 40%, 74,3% и 57,1% соответственно, совместно 94,3% [Ивашкин В.Т., 2017; Komova A., 2014; EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease., 2018].

Тяжесть АГ оценивалась с помощью индекса Мэддрей (Maddrey score) по формуле:  $4,6 \times (\text{ПВпациента} - \text{ПВконтроля}) + \text{уровень билирубина сыворотки (мкмоль/л)}/17$ . Значение  $\geq 32$  является критерием тяжелого АГ и отражает вероятность летального исхода в отсутствие специфического лечения в течение ближайшего месяца от 35 до 50%.

### **Методы исследования**

Всем исследуемым пациентам (в течение 7 дней – период обследования до включения в исследование) проведена клиническая оценка (сбор анамнеза, физический осмотр), стандартное лабораторное обследование (общий анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи, коагулограмма).

Лабораторное исследование проводилось на базе клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ «ГКБ имени В.В. Виноградова ДЗМ». Биохимические показатели сыворотки крови (аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), общий белок, альбумин, креатинин, мочевины, электролиты, щелочная фосфатаза (ЩФ), прямой и общий билирубин, холинэстераза (ХЭ), гаммаглутамилтранспептидаза (ГГТП)) определялись на автоматическом биохимическом анализаторе «Olympus 680» Beckman coulter, США. Оценка показателей свертывающей системы (протромбиновый индекс, МНО) проводилась на анализаторе «ACL TOP 700» Instrumentation laboratory (США). Показатели клинического анализа крови – на анализаторе «ADVIA 2120i» Siemens Healthcare Diagnostics Inc, США. У всех пациентов проводилось серологическое исследование маркеров вирусных гепатитов В и С иммуноферментным методом (HBsAg, HCVAb). Забор крови проводился из локтевой вены больного утром, натощак (не менее чем через 8 ч после последнего приема пищи).

Проводились инструментальные исследования - рентгенография грудной клетки, ЭКГ по стандартной методике с регистрацией 12 стандартных отведений при поступлении и при выписке, ультразвуковое исследование брюшной полости и почек. С целью оценки степени фиброза печени проводилась непрямая эластометрия (FibroScan 502 Touch, Echosens, Франция). У пациентов с ИМТ  $> 28$  кг/м<sup>2</sup> использовался датчик XL. Исследование проводилось 10 последовательными измерениями в одной точке [Soresi M., 2014]. Результат представлен в виде среднего значения (Emed.), измеряемого в кПа: F0 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 – более 12,6 кПа (с учетом данных Кокрановского обзора, включавший 834 пациента с алкогольной болезнью печени [Pavlov C.S., 2015]).

### **Методы изучения цитокинов, маркеров эндотелиальной дисфункции**

Содержание маркеров ЭД и цитокинов определяли через 7 дней после госпитализации с использованием коммерческих ИФА наборов в лаборатории биохимии Национального научного центра наркологии - филиала ФГБУ НМИЦ ПН МЗ РФ имени В.П. Сербского» [Bardou-Jacquet E., 2013]. Содержание ИЛ-6, VEGF-A, s-ICAM-1 в сыворотке крови определяли с использованием коммерческих ИФА-наборов фирмы Bender MedSystems (Австрия). ИЛ-8 – с помощью ИФА-набора фирмы Invitrogen (США). END-1 определяли ИФА-набором фирмы Biomedica (Австрия). Из цельной крови выделяли тотальную ДНК на колонках с помощью набора реагентов «К-Сорб» (#EX-514, Синтол, Россия). В качестве референсных значений выступали внутрилабораторные концентрации маркеров, определенные у здоровых доноров, согласно методическим рекомендациям производителя соответствующих наборов. Аллельные варианты полиморфных локусов были определены посредством проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени,

используя термоциклер АНК-48 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) с помощью набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов *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), *EDN1* (rs1800541), *ИЛ-8* (rs4073) (#4351379, Thermo Fisher Scientific, США), согласно рекомендациям производителей.

### Характеристика сформированных групп

С учетом критериев включения и исключения из обследованных 922 пациентов в исследование было включено 177 пациентов (138 (77,9%) мужчин, средний возраст составил  $50 \pm 10,6$  лет).

Пациенты были разделены на 5 групп: I – группа сравнения ( $n=24$ , 13,6%), II – АГ нетяжелого течения ( $n=66$ , 37,3%), III – ЦП компенсированный ( $n=28$ , 15,7%), IV – ЦП декомпенсированный ( $n=32$ , 18,1%), V – тяжелый АГ ( $n=27$ , 15,3%).

Группа сравнения (ГС) составили 24 пациента, злоупотребляющие алкоголем, у которых не было выявлено патологии печени (степень фиброза F0; АЛТ, АСТ в N, отсутствие признаков жировой дистрофии печени по УЗИ органов брюшной полости) и другой соматической патологии по результатам обследования.

Сформированные группы были сопоставимы по возрасту, ИМТ, длительности алкогольного анамнеза. Группа пациентов с АГ нетяжелого течения отличалась по гендерному признаку (количество женщин было достоверно меньше), что обусловлено более редким обращением в центр наркологии лиц женского пола.

На момент включения в исследование группа декомпенсированного ЦП отличалась от I, II, III и V групп достоверно меньшим количеством употребляемого алкоголя. В данной группе основным поводом для госпитализации являлось нарушение режима терапии на амбулаторном этапе (нарушение режима и дозировок диуретиков).

Общая характеристика пациентов в сформированных группах представлена в таблице 1.

В I, II, III группах прием лекарственных препаратов исключался за 2 дня до включения в исследование. Пациентов с декомпенсированным ЦП и АГ тяжелого течения получали терапию основного заболевания (неселективные бета-блокаторы (анаприлин), верошпирон). Прием других лекарственных препаратов, способных оказывать влияние на РААС не регистрировался, ввиду исключения пациентов с сопутствующими заболеваниями из исследования.

Пациенты I, II, III групп обращались за наркологической помощью в наркологический диспансер Национального научного центра наркологии - филиала ФГБУ НМИЦ ПН МЗ РФ имени В.П. Сербского». У пациентов II, III групп было стабильное течение АБП. Пациенты IV и V группы госпитализировались по поводу декомпенсации функции печени в терапевтическое отделение ГБУЗ «ГКБ им. В.В. Виноградова ДЗМ». Больные I, II, III и V групп злоупотребляли алкоголем более 40-80 г в сутки в течение 4-8 недель. Больные IV группы систематически злоупотребляли алкоголем более 40-80 г/сутки в анамнезе до постановки диагноза цирроза печени.

Таблица 1.

### Сравнительная характеристика пациентов, включенных в исследование ( $n=177$ )

Показатели	Стабильное течение			Декомпенсация функции печени	
	I ГС ( $n=24$ )	II АГ нетяжелый ( $n=66$ )	III ЦП компенсированный ( $n=28$ )	IV ЦП декомпенсированный ( $n=32$ )	V АГ тяжелый ( $n=27$ )
Возраст, лет	$48,0 \pm 8,5$	$47,3 \pm 10,45$	$52,1 \pm 9,5$	$52,85 \pm 10,53$	$53,1 \pm 10,5$
Пол М/Ж, n (%)	18 (69,3)/8 (30,7)	56 (90,32)/9 (9,68)*	18 (68,7)/9 (33,3)	22 (67,3)/10 (31,3)	18 (66,7)/9 (33,3)
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	$27,1 \pm 5,04$	$26,86 \pm 5,58$	$24,7 \pm 3,0$	$27,1 \pm 3,6$	$25,7 \pm 3,0$
Срок употребления алкоголя (лет)	$16,3 \pm 8,17$	$14,61 \pm 6,9$	$14,4 \pm 6,2$	$14,9 \pm 9,5$	$14,7 \pm 6,2$

Количество употребляемого алкоголя (перерасчет на этанол г/сут)	126,0±8,1	122,0±8,1	120,9±9,4	121,9±10,4#	122,1±9,3
Число положительных ответов по тесту CAGE	3,46±0,5	3,4±0,6	3,6±0,5	3,1±0,5	3,6±0,5
Число положительных ответов по тесту AUDIT	23,07±4,11	24,7±8,53	24,1±5,6	23,0±5,44	24,1±5,6

Примечание: здесь и далее данные представлены в виде среднего значения и его стандартного отклонения для количественных показателей и p (%) для качественных; \* - p<0,01 (с поправкой по Бонферрони) по сравнению с группой контроля. Здесь и далее серым цветом выделены группы с декомпенсацией функции печени. #-количество употребляемого алкоголя указано до постановки диагноза, после постановки диагноза употребление носило эпизодический характер (менее 40 г/сут) или полный отказ от употребления алкоголя.

## Клинико-лабораторная характеристика исследуемых групп.

Клинико-лабораторная характеристика исследуемых групп представлено в таблице 2.

**Таблица 2.**  
**Основные лабораторные показатели у лиц, злоупотребляющих алкоголем и АБП (n=177)**

Показатели	Стабильное течение			Декомпенсация функции печени	
	I ГС (n=24)	II АГ нетяжелый (n=66)	III КЦП (n=28)	IV ДЦП (n=32)	V АГ Тяжелый (n=27)
Гемоглобин, г/л (N 120-160)	145 [128;150]	143 [132;151]	121 [90;113]	100 [82;116]*#	102,0 [90,0;113,0]*
Ср. об. эритроцита, фл (N 80-100)	98,0 [89,1;108,7]	87,8 [81,0;94,6]	104,0 [97,0;112,0]	96,5 [85,3;103,0]	104,0 [97,0;112,0]
Лейкоциты, тыс/мкл (N4-9)	7,1 [5,4;9,9]	6,6 [5,3;8,4]	6,6 [6,3;7,9]	6,6 [5,3;8,3]	7,3 [6,3;10,4]
Тромбоциты, тыс/мкл (N 180-440)	189 [157;244]	209 [159;252]	181 [131;295]	154 [121;263]*#	129,5 [95,0;158,0]*
СОЭ, мм/час (N <10)	6 [5;7]	7 [6;7]	23 [15;41]* <sup>α</sup>	35 [26;50]*# <sup>α</sup>	38,5 [18,0;54,0]*
С-РБ мг/л (N <10)	3,12 [2,1;4,8]	3,0 [2,0;4,5]	12,7 [8,8;18,4]* <sup>α</sup>	28,9 [13,0;35,5]*# <sup>α</sup>	38,0 [11,9;86,0]* <sup>β</sup>
АЛТ, Ед/л (N <38)	18,1 [16,8;22,8]	53,5 [34,4;109,2]*	23,0 [12,5;35,8]	23,9 [16,0;36,8]	36,0 [29,0;59,0]
АСТ, Ед/л (N <38)	30,2 [26,5;34,9]	73,6 [54,2;111,4]* <sup>α</sup>	43,1 [31,3;80,7]*	39,0 [31,1;88,5]*	121,0 [85,9;201,0]* <sup>β</sup>
ГГТП, Ед/л (N <50)	45,9 [34;86,45]	75,15 [47,9;153,3]*	198,5 [44,0;297,0]* <sup>α</sup>	157,5 [62,0;220,0]* <sup>α</sup>	233,0 [116,0;426,5]* <sup>β</sup>
Билирубин общ., мкмоль/л (N 3-21)	9,9 [7,5;13,6]	13,1 [10,6;19,6]	21,7 [13,8;32,5]* <sup>α</sup>	52,8 [32,5;90,4]*# <sup>α</sup>	193,5 [124,8;403,0]* <sup>β</sup>
ЩФ, Ед/л (N 40-130)	127,6 [101,1;131,5]	202,5 [160,5;261,5]	116,0 [90,0;172,0]	120,5 [99,5;189,5]	201,0 [129,0;257,0] <sup>β</sup>
Общий белок, г/л (N 66-83)	72,2 [64,8;75,0]	70,8 [67,6;73,5]	67,7 [61,0;75,2]*	64,8 [58,8;70,6]*	65,1 [56,6;71,6]
Альбумин, г/л (N 35-53)	36,4 [27,8;44,9]	44,6 [42,0;47,2]	30,9 [25,0;35,0]* <sup>α</sup>	23,3 [21,3;26,7]*#	23,3 [21,0;25,6]*
Холестерин, ммоль/л (N 3,1-5,2)	4,9 [4,45;5,32]	6,3 [5,4;7,1]	4,4 [2,9;5,2] <sup>α</sup>	3,5 [2,8;4,2]* <sup>α</sup>	3,02 [1,9;5,1]*
Холинэстераза, Ед/л (N 3,93-11,5)	5,5 [4,8;6,4]	6,9 [5,1;8,9]	3,4 [2,4;5,2]* <sup>α</sup>	2,3 [1,7;2,1]*# <sup>α</sup>	2,1 [1,74;2,7]*
МНО	1,08 [1;03,1;1,10]	1,15 [1;08;1,22]	1,34 [1,20;1,51]*	1,8 [1,45;2,19]# <sup>α</sup>	1,99 [1,53;2,39]
ПИ, % (N 70-120)	97,0 [94,0;100,0]	91,0 [84,0;100,0]	68,0 [60,0;80,0]*# <sup>α</sup>	44,5 [34,5;56,0]* <sup>α</sup>	40,0 [34;61,0]*
Креатинин, мкмоль/л (N 59-104)	81,0 [77,0;94,0]	91,0 [88,0;95,0]	88,0 [71,2;145,1]	87,0 [63,0;116,0]	83,0 [71,0;145,0]
Асцит, n (%)	0 (0)	0 (0)	17 (60,7)* <sup>α</sup>	30 (93,8)*# <sup>α</sup>	23 (85,2)*
Спленомегалия, n (%)	0 (0)	0 (0)	8 (28,6)* <sup>α</sup>	30 (93,8)*# <sup>α</sup> <sup>β</sup>	6 (22,2)*
ВРВП, n (%)	0 (0)	0 (0)	2 (8,2)* <sup>α</sup>	12 (42,8)*# <sup>α</sup>	12 (44,4)*
Диаметр воротной вены, >12 мм	10,3 [9,2;11,0]	11,2 [10,1;11,3]	13,0 [12,0;14,0]* <sup>α</sup>	14,0 [12,0;14,0]* <sup>α</sup>	14,0 [12,0;15,0]*
Плотность печени, кПа (N <5,8)	3,1 [2,9;3,6]	11,8 [4,3;12,0]*	34,0 [15,1;75]* <sup>α</sup>	62,7 [29,1;75]*# <sup>α</sup>	66,4 [61,5;75]*
Индекс Мэддрей	-	8±1,13	-	-	63±15,3

Средний балл по СТР			6,7±1,9	12,8±0,6	12,7±0,8
---------------------	--	--	---------	----------	----------

\* - по сравнению с группой сравнения, #- между группой IV и III, α-по сравнению с группой II, β-между группами IV и V; с учетом поправки по Бонферри на количество исследуемых групп достоверными были результаты при  $p < 0,01$

Группы I и II были сопоставимы по основным «рутинным» показателям, за исключением закономерного достоверного повышения уровня ГГТП, цитолиза и плотности печени ( $p < 0,01$ ) у пациентов с нетяжелым АГ, которые отличалась от ГС.

Группы пациентов с компенсированным и декомпенсированным ЦП закономерно достоверно отличались от ГС снижением показателей функции печени; наличием холестаза. Кроме того, данные группы отличались более выраженными показателями активного воспаления в печени: достоверное повышение трансаминаз, СОЭ и С-РБ, а также плотностью печени ( $p < 0,01$ ), наличием асцита, ВРВП, спленомегалии

Группа пациентов с компенсированным ЦП достоверно отличалась от группы нетяжелого АГ повышением плотности печени, снижением показателей функции печени, повышением уровня общего билирубина, ГГТП; более выраженными показателями СОЭ и С-РБ, наличием асцита, ВРВП, спленомегалии, наличием портальной гипертензии, при более низком уровне АСТ ( $p < 0,01$ ).

Группы, составленные из пациентов с декомпенсацией функции печени - декомпенсированного ЦП и тяжелого АГ, закономерно отличались от групп заболеваний печени со стабильным течением более выраженным воспалением (С-РБ и СОЭ), повышением плотности печени, гипербилирубинемией, снижением белково-синтетической функцией (альбумин, ХЭ, ПИ, общий белок, холестерин), тромбоцитопенией, при более частой встречаемости спленомегалии, асцита и ВРВП. При этом, между собой, данные группы, были сопоставимы по всем клиническим, лабораторным и инструментальным показателям за исключением более высокого уровня С-РБ, АСТ, ГГТП, общего билирубина и ЩФ среди пациентов с тяжелым АГ, при более частой встречаемости спленомегалии среди пациентов с декомпенсированным ЦП.

Группы нетяжелого и тяжелого АГ закономерно отличались индексом Меддрей. Группы с декомпенсацией функции печени были сопоставимы по количеству баллов по шкале СТР.

### Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных в исследовании данных проведена с использованием программного обеспечения Statistica (версия 8.0 для Windows). Определение нормальности выборки проводилось расчетом критериев Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка, построением частотной гистограммы, ящичной гистограммы, нормально-вероятностного графика и оценкой косвенных признаков - коэффициента асимметрии и эксцесса.

В случае нормального распределения переменных в выборке количественные данные приведены в виде  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее значение,  $SD$  – стандартное отклонение. Для непрерывных параметров, распределенных ненормально, была рассчитана медиана и определен интерквартильный размах ( $Me [IQR]$ ). Качественные переменные описаны абсолютными ( $n$ ) и относительными (%) величинами.

Для оценки статистической достоверности различий между группами применялись непараметрические критерии Манна-Уитни (для несвязанных групп) и Вилкоксона (для связанных групп), при сравнении более двух независимых выборок предварительно применяли критерий Краскела-Уоллиса. Корреляционный анализ был осуществлен с использованием рангового анализа по Спирмену. Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых признаков использовали таблицы сопряженности и критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ) с поправкой Йейтса при ожидаемых частотах более 10 и точный критерий Фишера при ожидаемых частотах менее 10. Для выявления многомерных зависимостей между различными признаками использовали процедуры многофакторного пошагового регрессионного анализа. Для оценки диагностической эффективности показателей использовали ROC-анализ с определением площади под кривой (AUC). При анализе

выбирались оптимальные пороговые значения для максимальной суммы чувствительности и специфичности. На основании пороговых значений, рассчитывалась чувствительность и специфичность. Для количественной оценки влияния непрерывных и дискретных факторов на бинарный параметр проводился логистический регрессионный анализ с расчетом отношения шансов (ОШ). Статистически значимым считались результаты при значениях  $p < 0,05$ . Статистическая достоверность рассчитывалась с учетом поправки по Бонферрони при наличии множественных сравнений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Исследование цитокинового статуса у лиц, злоупотребляющих алкоголем и АБП

Уровни цитокинов были выше референсных значений у всех лиц, злоупотребляющих алкоголем, во всех группах.

Группа АГ нетяжелого течения достоверно не отличалась по интерлейкиновому статусу от ГС. Наличие компенсированного ЦП отличалось достоверным повышением уровней ИЛ-6 и ИЛ-8 по сравнению с ГС и нетяжелого АГ ( $p < 0,01$ ). При этом группы декомпенсированного ЦП и АГ тяжелого течения отличалась более высокими уровнями всех исследуемых интерлейкинов по сравнению с группами со стабильным течением заболевания печени. АГ тяжелого течения отличается от декомпенсированного цирроза печени достоверным повышением только ИЛ-8 ( $p < 0,01$ ).

Сравнение уровней цитокинов отражено в таблице 3.

Таблица 3.

Содержание цитокинов у пациентов (n=177)

Показатели	Стабильное течение			Декомпенсация функции печени	
	I ГС (n=24)	II АГ нетяжелый (n=66)	III ЦП компенсированный (n=28)	IV ЦП декомпенсированный (n=32)	V АГ тяжелый (n=27)
ИЛ-6, пг/мл (N 0,5±0,2)	1,2 [0;1,75]	1,2 [0;1,9]	5,8 [2,38;18,2]*	24,3 [10,5;58,8]*#	14,4 [8,05;29,2]*
ИЛ-8, пг/мл (N 0,4±0,3)	1,8 [0,3;5,1]	3,0 [0,8;4,5]	14,6 [6,5;33,8]*	45,1 [13,6;71,8]*#	130,65 [35,85;287,6]* <sup>α</sup>

Примечание: здесь и далее данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (LQ-UQ); \* -  $p < 0,01$  по сравнению с группой сравнения и НАГ; # -  $p < 0,01$  между III и IV; α - между группами IV и V. Статистическая достоверность с поправкой Бонферрони ( $p < 0,01$ ).

### Исследование маркеров ЭД у лиц, злоупотребляющих алкоголем и АБП

У лиц, злоупотребляющих алкоголем без патологии печени и в группе АГ нетяжелого течения, отмечалось повышение выше референсных значений только уровней VEGF-A и EDN-1, при нормальном уровне s-ICAM-1, без достоверных различий между данными группами ( $p > 0,01$ ).

Наличие ЦП сопровождается достоверным повышением всех исследуемых молекул, по сравнению с ГС и нетяжелого АГ. Декомпенсация ЦП сопровождается повышением s-ICAM-1 и EDN-1 по сравнению с компенсированным ЦП, при статистически равном уровне VEGF-A между ними. АГ тяжелого течения сопровождается достоверным повышением s-ICAM-1 по сравнению с группами стабильного течения заболевания печени, так и с группой декомпенсированного ЦП, при равномерном распределении уровней EDN-1 между обеими группами и меньшем уровне VEGF-A, чем при декомпенсированном циррозе печени и равнозначным группам хронических стабильных состояний ( $p < 0,01$ ).

Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Распределение маркеров ЭД у лиц, злоупотребляющих алкоголем и АБП (n=177)

Показатели	Стабильное течение			Декомпенсация функции печени	
	I ГС (n=24)	II АГ нетяжелый	III ЦП компенсированный	IV ЦП декомпенсированный	V АГ тяжелый

		(n=66)	(n=28)	(n=32)	(n=27)
<b>VEGF-A, пг/мл</b>	359,4	385,8	944,0	970,3	497,7
(N 273,6±38)	[310,1;452,1]	[253,8;647,6]	[443,4;1440,4]* <sup>α</sup>	[420,6;1493,0]* <sup>α</sup>	[306,3;703,8]
<b>s-ICAM, пг/мл</b>	273,0	244,5	638,0	1065,5	1510,0
(N 311±27)	[172;415]	[165,5;389]	483,0;874,0]*	[870,0;1448,0]* <sup>#</sup>	[1060,0;1684,0]* <sup>α</sup>
<b>EDN-1,</b>	1,02	1,1	1,3	2,3	1,9
<b>фмоль/мл</b>	[0,0;1,6]	[0,85;1,71]	[0,9;2,24]*	[1,3;3,2]* <sup>#</sup>	[1,1;4,8]*
(N 0,26±0,13)					

Примечание: здесь и далее данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (LQ-UQ); \* -  $p < 0,01$  по сравнению с группой сравнения и НАГ; # -  $p < 0,01$  между III и IV;  $\alpha$  – между группами IV и V. Статистическая достоверность с поправкой Бонферрони ( $p < 0,01$ ).

### **Изучение ассоциаций между уровнем цитокинов, маркеров ЭД и клинико-лабораторными показателями пациентов.**

Среди пациентов, злоупотребляющих алкоголем без патологии печени и АГ нетяжелого течения не выявлено корреляционных связей между уровнями интерлейкинов и маркеров ЭД с клинико-лабораторными показателями пациентов.

У пациентов с компенсированным ЦП повышение уровней ИЛ-6 коррелировало с более низкими значениями альбумина ( $r = -0,54$ ,  $p < 0,05$ ). Повышение концентрации ИЛ-8 коррелировало с повышением плотности печени ( $r = +0,88$ ,  $p < 0,05$ ), ЩФ ( $r = +0,51$ ,  $p < 0,05$ ), общего билирубина ( $r = +0,49$ ,  $p < 0,05$ ) и меньшего значения ПИ ( $r = -0,55$ ,  $p < 0,05$ ). Повышение концентрации s-ICAM-1 коррелировало с повышением плотности печени ( $r = +0,89$ ,  $p < 0,05$ ), ЩФ ( $r = +0,53$ ,  $p < 0,05$ ), общего билирубина ( $r = +0,43$ ,  $p < 0,05$ ), воротной вены ( $r = +0,5$ ,  $p < 0,05$ ) и меньшего значения ПИ ( $r = -0,43$ ,  $p < 0,05$ ).

Уровни VEGF-A и EDN-1 не показали достоверных корреляций с лабораторными и инструментальными показателями пациентов.

У пациентов с декомпенсированным ЦП повышение уровня ИЛ-8 коррелировало с повышением уровня ГГТП ( $r = +0,51$ ,  $p < 0,05$ ), АСТ ( $r = +0,58$ ,  $p < 0,05$ ), лейкоцитов ( $r = +0,4$ ,  $p < 0,05$ ), общего билирубина ( $r = +0,54$ ,  $p < 0,05$ ).

Повышение уровня s-ICAM-1 коррелирует с уровнем общего билирубина ( $r = +0,48$ ,  $p < 0,05$ ), АСТ ( $r = +0,46$ ,  $p < 0,05$ ). Корреляционной связи уровней ИЛ-6, VEGF-A, EDN-1 с лабораторными показателями не выявлено.

При исследовании корреляции исследуемых биомолекул с клинико-лабораторными показателями среди пациентов с АГ тяжелого течения выявлена связь уровня ИЛ-6 с С-РБ ( $r = +0,49$ ,  $p < 0,05$ ) и уровня ИЛ-8 с уровнями с уровнем общего билирубина ( $r = +0,56$ ,  $p < 0,05$ ), АСТ ( $r = +0,59$ ,  $p < 0,05$ ), ЩФ ( $r = +0,45$ ,  $p < 0,05$ ), ГГТП ( $r = +0,51$ ,  $p < 0,05$ ).

Однако многофакторный корреляционный анализ не подтвердил достоверной корреляции уровней интерлейкинов и маркеров ЭД с клинико-лабораторными показателями пациентов во всех исследуемых группах.

### **Исследование частот вариантных аллелей полиморфных локусов генов цитокинов и маркеров ЭД среди пациентов со стабильным течением заболеваний печени на фоне злоупотребления алкоголем.**

При исследовании распространенности частот генотипов и аллелей полиморфных локусов *ИЛ-6* (rs1800795 C/G), *ИЛ-8* (rs4073 A/T), *VEGF-A* (rs699947 C/A и rs2010963 G/C), *ICAM-1* (rs281437 C/T) и *EDN-1* (rs1800541 T/G) между нетяжелым АГ и компенсированным ЦП по сравнению с ГС различий не выявлено ( $p > 0,001$  для генотипов и  $p > 0,003$  для аллелей, соответственно).

### **Генетические детерминанты уровней цитокинов и маркеров ЭД среди пациентов со стабильными течением заболеваний печени.**

У пациентов с компенсированным ЦП носительство всех вариантов аллелей генотипов полиморфных локусов rs1800795 *ИЛ-6* и rs4073 A/T *ИЛ-8* ассоциируется с более высокими уровнями соответствующих интерлейкинов по сравнению с ГС и нетяжелого АГ ( $p < 0,0008$ ). Однако, различий по уровню исследуемых молекул в пределах одной группы в зависимости от генотипа аллеля не выявлено.

Были получены результаты распределения более высоких уровней маркеров ЭД между всеми аллелями/генотипами полиморфных локусов соответствующих генов в группе компенсированного ЦП, при отсутствии достоверных различий между аллелями и генотипами внутри группы.

### **Исследование частот вариантных аллелей полиморфных локусов генов цитокинов и маркеров ЭД среди пациентов с декомпенсацией функции печени.**

При изучении распределения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных локусов групп с декомпенсацией функции печени не было выявлено различий как по сравнению с группой сравнения, так и между друг другом.

Проведение сравнительной характеристики распределения исследуемых молекул в зависимости от аллеля/генотипа соответствующего полиморфного локуса между группами декомпенсированного ЦП и АГ тяжелого течения показало ассоциацию аллеля Т и генотипа ТТ локуса rs4073 гена *ИЛ-8* с более высокими уровнями ИЛ-8 у пациентов с тяжелым АГ (таблица 5).

Достоверного влияния аллеля/генотипа полиморфных локусов генов маркеров ЭД на соответствующую молекулу выявлено не было.

**Таблица 5.**

### **Распределение концентраций ИЛ в зависимости от аллельных вариантов полиморфных локусов среди пациентов с декомпенсацией функции печени (n=48).**

	ЦП декомпенсированный (n=28)	АГ тяжелый (n=20)	p #	Н критерий Краскела- Уоллиса (значение p)
<b>rs1800795 (ИЛ-6)</b>				
CG, пг/мл	12,3 [12,0-52,4]	26,0 [11,8-32,4]	p=0,52	5,2
CC, пг/мл	12,0 [7,4-35,4]	34,3 [15,8-48,0]	p=0,21	(p=0,39)
GG, пг/мл	33,95 [14,2-124,0]	9,0 [3,2-13,0]	p=0,08	
C, пг/мл	24,3 [10,5-38,0]	26,7 [13,8-38,7]	p=0,79	4,47
G, пг/мл	25,3 [12,8-60,2]	3,0 [2,2-5,6]	p=0,12	(p=0,21)
<b>rs4073 (ИЛ-8)</b>				
AT, пг/мл	56,6 [12,5-77,5]	1,8 [0,0-25,6]	p=0,065	6,9
TT, пг/мл	29,4 [12,4-68,2]	95,2 * [55,2-256,95]	p=0,07	(p=0,22)
AA, пг/мл	39,3 [23,2-59,9]	3,95 [1,8-5,6]	p=0,067	
T, пг/мл	53,8 [12,5-69,1]	45,0 * [0,3-145,1]	p=0,054	4,75
A, пг/мл	39,9 [13,6-71,8]	2,1 [0,65-10,5]	p=0,07	(p=0,19)

#- при сравнении уровней ИЛ по генотипам/аллелям между группами по U-критерию Манна-Уитни

\*- статистическая достоверность распределения уровней ИЛ между генотипами/аллелями пациентов одной группы посчитана по U-критерию Манна-Уитни

Достоверность с поправкой Бонферрони для генотипов p<0,005 и p<0,008 для аллелей

### **Прогностическая значимость цитокинового профиля, маркеров ЭД и полиморфных локусов их генов при алкогольной болезни печени.**

Проведение логистического регрессионного анализа показало отсутствие прогностического значения клинико-лабораторных, инструментальных, иммуновоспалительных и генетических факторов наличия нетяжелого алкогольного гепатита.

Проведение логистического регрессионного анализа и определение пороговых уровней ROC-анализом полученных количественных значений показали независимую ассоциацию

ИЛ-6 >3,2 пг/мл [ОШ=2,1 95%ДИ (1,01-4,8), p=0,049; чувствительность 72,3 % и специфичность 88,7 %] и VEGF-A >614,6 пг/мл [ОШ=1,6 95%ДИ (1,1-2,5), p=0,014; чувствительность 72,9 % и специфичность 67,8 %] с наличием цирроза печени вне зависимости от компенсации. Пороговое значение ИЛ-6 > 8,5 пг/мл [ОШ=1,14 95%ДИ (1,09-1,32), p=0,001; чувствительность 77,8 % и специфичность 71,4 %] указывает на декомпенсацию ЦП.

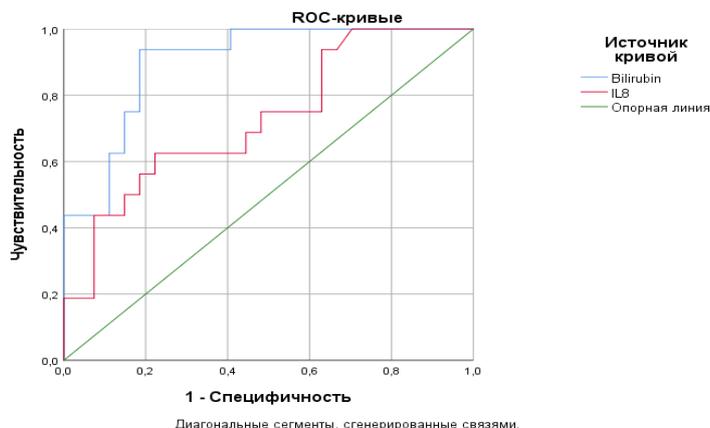
Кроме того, проведение логистического регрессионного анализа с расчетом пороговых уровней ROC-кривыми показало, независимую ассоциацию ИЛ-8 >71,8 [ОШ=1,01 95%ДИ (1,001-1,02), p=0,045] и общего билирубина [ОШ=1,03 95%ДИ (1,01-1,04), p=0,046] с развитием декомпенсации функции печени на фоне тяжелого алкогольного гепатита по сравнению с декомпенсацией на фоне ЦП (таблица 6 и рисунок 2).

Таблица 5.

**Независимые предикторы наличия декомпенсации функции печени на фоне тяжелого алкогольного гепатита.**

Показатель	Пороговый уровень	AUC	ДИ (95%)	Чувствительность	Специфичность	ППЗ	НПЗ
ИЛ-8, пг/мл	>71,8	0,728	0,571-0,885	62,5	77,8	62,5	77,8
Общий билирубин, мкмоль/л	>107,4	0,900	0,811-0,990	92,31	84,37	82,8	93,1

Рисунок 2. ROC кривая ИЛ-8 и билирубина с AUC



Таким образом, у лиц, с сопоставимых по количеству и длительности злоупотребления алкоголем, продемонстрировано изменение иммуновоспалительных молекул в зависимости от варианта алкогольного поражения печени. Злоупотребление алкоголем, вне зависимости от повреждения печени, сопровождалось повышением уровней ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A, EDN1. Группы нетяжелого алкогольного гепатита и лица, злоупотребляющие без патологии печени, сопоставимы по уровню всех исследуемых цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции. Наличие цирроза печени сопровождается повышением всех иммуновоспалительных молекул: ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A, s-ICAM-1, EDN1. Декомпенсация функции печени сопровождается значительным повышением ИЛ-6, ИЛ-8, s-ICAM-1, EDN-1. Цирроз печени, вне зависимости от уровня компенсации функции печени, сопровождается наибольшими концентрациями VEGF-A. Не выявлено ассоциаций между вариантными аллелями полиморфных локусов генов ИЛ-6 (rs1800795), ИЛ-8 (rs4073), VEGF-A (rs699947 и rs2010963) и ICAM-1 (rs281437), EDN-1 (rs1800541) с алкогольной

болезнью печени и уровнем соответствующих молекул за исключением генотипа ТТ локуса rs4073 А/Т ассоциирующегося с более высокими уровнями ИЛ-8 при тяжелом алкогольном гепатите. Выявление уровня ИЛ-8 более 71,8 пг/мл и/или общего билирубина более 107,4 мкмоль/л могут предсказывать развитие декомпенсации печени на фоне алкогольного эксцесса.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлено повышение уровней ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A, s-ICAM-1, EDN-1 при всех вариантах АБП, при этом у лиц с нетяжелым АГ и у злоупотребляющих алкоголем без поражения печени уровни цитокинов и VEGF-A, EDN-1 повышены незначительно и без достоверного отличия между группами. Максимальное повышение всех интерлейкинов и маркеров эндотелиальной дисфункции наблюдается при декомпенсации ЦП и тяжелом АГ, без достоверной разницы уровня VEGF-A в группах цирроза печени и достоверно высоким уровнем ИЛ-8 при АГ тяжелого течения.
2. Установлено отсутствие корреляционной связи между уровнями ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A, s-ICAM-1, EDN-1 с параметрами белково-синтетической функции печени (альбумин, ПИ, холинэстераза, холестерин), портальной гипертензии (асцит, РВВП, спленомегалией), желтухой, показателями активности воспаления в печени (АСТ, АЛТ, лейкоциты, СОЭ) и плотности печени у лиц с АБ, вне зависимости от варианта алкогольного поражения печени.
3. Определены пороговые уровни ИЛ-6  $>3,2$  пг/мл (чувствительность 72,3 % и специфичность 88,7 %), VEGF-A  $>614,6$  пг/мл (чувствительность 72,9 % и специфичность 67,8 %) указывающие на наличие ЦП, увеличение порогового уровня ИЛ-6  $>8,5$  пг/мл независимо ассоциируется с декомпенсацией цирроза.
4. Вариантные аллели локусов генов *ИЛ-6* (rs1800795 C/G), *VEGF-A* (rs699947 C/A и rs2010963 G/C), *ICAM-1* (rs281437 C/T) и *EDN-1* (rs1800541 T/G) не ассоциируются с АБП, не отвечают за повышение соответствующих молекул в сыворотки крови. Не установлено влияния указанных вариантных аллелей на клиническую картину АБП.
5. При АГ тяжелого течения аллель Т и генотип ТТ полиморфного локуса rs4073 А/Т гена *ИЛ-8* связан с высокими уровнями ИЛ-8 в сыворотки крови по сравнению с декомпенсированным ЦП, без изменения частоты аллелей и генотипов между данными группами. При этом данный полиморфизм не оказывает влияния на клиническую картину тяжелого АГ.
6. При декомпенсации печеночной недостаточности на фоне АБП уровень ИЛ-8  $>71,8$  пг/мл с чувствительностью 62,5 %, специфичностью 77,8 % и общего билирубина  $>107,4$  мкмоль/л с чувствительностью 92,31%, специфичностью 84,37% являются маркерами алкогольного эксцесса как причины декомпенсации функции печени.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Нецелесообразно определять уровни цитокинов и маркеров ЭД у злоупотребляющих алкоголем пациентов без клинических признаков АБП с целью верификации АГ нетяжелого течения.
2. У лиц с АБП можно оценивать уровни ИЛ-6 и VEGF-A в качестве дополнительных маркеров наличия цирроза печени.
3. Пациентам с декомпенсацией печеночной функции на фоне АБП следует дополнительно определять уровень ИЛ-8 и общего билирубина для уточнения алкогольной этиологии декомпенсации.
4. Пациентам с алкогольным гепатитом тяжелого течения с точки зрения персонифицированной медицины можно рекомендовать фармакогенетическое тестирование определения генотипа ТТ локуса rs4073 A>T *ИЛ-8* в качестве маркера высоких уровней ИЛ-8 для дальнейших исследований возможностей патогенетической терапии.

**Иванов Александр Сергеевич (Российская Федерация)****Иммуновоспалительные и генетические аспекты алкогольной болезни печени.**

У 177 лиц, с сопоставимым по количеству и длительности уровнем злоупотребления алкоголем, различными вариантами алкогольной болезни печени или без патологии печени, исследованы уровни цитокинов, маркеров эндотелиальной дисфункции и их полиморфные локусы. Злоупотребление алкоголем, вне зависимости от повреждения печени, сопровождалось повышением уровней ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A, EDN1. Пациенты с нетяжелым алкогольным гепатитом и злоупотребляющие без патологии печени были сопоставимы по уровню всех исследуемых цитокинов и маркеров эндотелиальной дисфункции. Наличие цирроза печени сопровождается повышением ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A, s-ICAM-1, EDN1. Развитие декомпенсации функции печени сопровождается значительным повышением ИЛ-6, ИЛ-8, s-ICAM-1, EDN1. Наибольшие уровни VEGF-A наблюдались при циррозе печени без зависимости от уровня компенсации функции печени. Не выявлено ассоциаций между вариантными аллелями полиморфных локусов генов ИЛ-6 (rs1800795), ИЛ-8 (rs4073), VEGF-A (rs699947 и rs2010963) и ICAM-1 (rs281437), EDN-1 (rs1800541) с алкогольной болезнью печени и уровнем соответствующих молекул за исключением генотипа ТТ локуса rs4073 А/Т ассоциирующегося с более высокими уровнями ИЛ-8 при тяжелом алкогольном гепатите. Выявление уровня ИЛ-8 более 71,8 пг/мл и/или общего билирубина более 107,4 мкмоль/л могут предсказывать развитие декомпенсации печени на фоне алкогольного эксцесса.

**Ivanov Alexander Sergeevich (Russian Federation)****Immunoinflammatory and genetic aspects of alcoholic liver disease.**

The levels of cytokines, endothelial dysfunction markers and their polymorphic loci were studied in 177 individuals, with a comparable in quantity and duration level of alcohol abuse, various variants of alcoholic liver disease or without liver pathology. Alcohol abuse, regardless of liver damage, was accompanied by increased levels of IL-6, IL-8, VEGF-A, EDN1. Patients with mild alcoholic hepatitis and abusing liver without pathology were comparable in terms of all the studied cytokines and endothelial dysfunction markers. The presence of cirrhosis is accompanied by an increase in IL-6, IL-8, VEGF-A, s-ICAM-1, EDN1. The development of liver decompensation is accompanied by a significant increase in IL-6, IL-8, s-ICAM-1, EDN1. The highest levels of VEGF-A were observed in cirrhosis of the liver without dependence on the level of compensation of the liver function. No associations were found between the variant alleles of the polymorphic loci of the IL-6 (rs1800795), IL-8 (rs4073), VEGF-A (rs699947 and rs2010963) and ICAM-1 (rs281437) genes and EDN1 (rs1800541) genes with alcoholic liver disease and the level of the corresponding biomolecules with the exception of the TT genotype of the rs4073 A/T locus associated with higher levels of IL-8 in severe alcoholic hepatitis. Detection of IL-8 levels of more than 71.8 pg / ml and / or total bilirubin of more than 107.4  $\mu$ kmol/l can predict the development of liver decompensation in the presence of alcoholic excesses.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Иванов, А.С. Значение иммуновоспалительных и генетических факторов в развитии алкогольного фиброза печени. / Иванов А.С., Гармаш И.В., Аришева О.С., Теребилина Н.Н., Баронец В.Ю., Перегуд Д.И., Кобалава Ж.Д. // Клиническая фармакология и терапия. – 2018 - №5- Т.27.-.С. 30-35.
2. **Иванов, А.С. Взаимосвязь полиморфных локусов, расположенных в промоторных областях генов VEGF (rs699947 и rs2010963), ICAM1 (rs281437) и ET-1 (rs1800541), с уровнем соответствующих белковых продуктов в сыворотке крови и риском развития алкогольного цирроза печени. / Иванов А.С., Гармаш И.В., Аришева О.С., Маркова М.А., Мельник А.С., Теребилина Н.Н., Баронец В.Ю., Перегуд Д.И., Тарасенко Е.В., Кобалава Ж.Д. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2018 -Т.73. - №6. - 368-377.**
3. **Иванов, А.С. Взаимосвязь вариантов полиморфных локусов генов ИЛ-6 (RS1800795) и ИЛ-8 (RS4073) с уровнем соответствующих цитокинов в сыворотке крови при остром алкогольном гепатите. / Иванов А.С., Гармаш И.В., Аришева О.С., Теребилина Н.Н., Баронец В.Ю., Перегуд Д.И., Кобалава Ж.Д. // Трудный пациент. – 2018.-.Т. – 16. -№12.- .С.24-28.**
4. **Иванов, А.С. Полиморфные локусы в промоторных областях генов провоспалительных цитокинов ассоциированные с тяжестью алкогольной болезни печени. / Иванов А.С., Гармаш И.В., Аришева О.С., Теребилина Н.Н., Баронец В.Ю., Перегуд Д.И., Тарасенко Е.В., Кобалава Ж.Д. // Клиническая медицина. -2019.-Т.-97.- №2 – .С.138-146.**
5. Иванов, А. С. Цитокиновый статус при алкогольной болезни печени. / Иванов А. С., Балашова А.А., Аришева О. С., Гармаш И.В., Кобалава Ж.Д.// Материалы 44-й сессии ЦНИИ гастроэнтерологии «Персонализированная медицина в эпоху стандартов» 1-2 марта 2018 года. Журнал Доказательная гастроэнтерология. 2018 – Приложение 1.-. С. 81.
6. Иванов, А. С. Эндотелиальная дисфункция при алкогольном фиброзе печени. /Иванов А. С., Балашова А. А., Аришева О. С., Гармаш И.В., Кобалава Ж. Д. // По материалам XXIII Международного Конгресса «Гепатология сегодня» 23-25 марта 2018. Москва. Журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2018 – Приложение № 51. - .С.-6
7. Иванов, А. С. Полиморфный локус rs4073 гена IL-8 ассоциированный с тяжестью острого алкогольного гепатита. / Иванов А. С., Балашова А.А., Аришева О. С., Гармаш И.В., Кобалава Ж.Д.// Материалы 45-й сессии ЦНИИ гастроэнтерологии «Вопросы онкологии в практике гастроэнтеролога» 28 февраля-1 марта 2019 года. Москва. Журнал Доказательная гастроэнтерология. 2019 - Т. – 8. -№1.- .С.16.

- 8. Иванов, А.С. Влияние маркеров эндотелиальной дисфункции, цитокинового статуса, гена коллагена COL1A1\_1 на развитие фиброза печени у пациентов, злоупотребляющих алкоголем / Тарасенко Е. В., Гармаш И. В., Мяндина Г. И., Аришева О. С., Желудова Е. М., Азова М. М., Теребилина Н. Н., Баронец В. Ю., Кобалава Ж. Д. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2019.- Т. 63. № 3. С. 55-63.**
  
- 9. Перегуд, Д.И. Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии. / Перегуд Д.И., Баронец В.Ю., Панченко Н.Ф., Теребилина Н.Н., Иванов А.С., Гармаш И.В., Кобалава Ж.Д. // По материалам IV российской конференции с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» 22-23 мая 2018г. Томск. Сборник тезисов по материалам IV всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии». 2018-.С. 115-117.**
  
- 10. Ivanov, A.S. Gene polymorphism of interleukins and their importance in the development of endothelial dysfunction and systemic diseases in patient with alcohol abuse. / Ivanov A.S., Soselia N.N., Pokatilova N.S. // Сборник статей по материалам четвертой международной научно-практической конференции «Современная парадигма научного знания: актуальность и перспективы». 13 апреля 2016г. Москва. Современная парадигма научного знания: актуальность и перспектива. 2016. – .С. 138-141**
  
- 11. Хомова, И.А. Регресс фиброза печени у пациентов с алкогольным циррозом на фоне длительной абстиненции. / Хомова, И.А., Иванов А.С., Аришева О.С., Гармаш И.В. // Внутренняя медицина в клинических наблюдениях. 2018 -№ 18.-. С. 96-103**

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП- алкогольная болезнь печени  
АГ – алкогольный гепатит  
АЛТ- аланинаминотрансфераза  
АСТ- аспарагинаминотрансфераза  
ГС-группа сравнения  
ГГТП- гамма-глутамилтранспептидаза  
ИМТ- индекс массы тела  
КИ - клиническое исследование  
МНО- международное нормализованное отношение  
ПИ - протромбиновый индекс  
ФП - фиброз печени  
ЦП - цирроз печени  
ЩФ - щелочная фосфатаза  
ХАИ - хроническая алкогольная интоксикация  
ХЭ - холинэстераза  
ЭД - эндотелиальная дисфункция  
ИЛ-6- интерлейкин-6  
*ИЛ-6* - ген интерлейкина-6  
ИЛ-8- интерлейкин-8  
*ИЛ-8* – ген интерлейкина-8  
VEGF- A -васкулоэндотелиальный фактор роста А  
*VEGF- A* – ген васкулоэндотелиального фактора роста А  
s-ICAM-1- растворимая форма молекулы межклеточной адгезии 1  
*s-ICAM-1*- ген растворимой формы молекулы межклеточной адгезии 1  
EDN- 1 - эндотелин-1  
*EDN- 1* – ген эндотелина-1