

На правах рукописи

Падучева Светлана Вячеславовна

**КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ**

14.01.04 – Внутренние болезни

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Пермь – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Щёктова Алевтина Павловна
Булатова Ирина Анатольевна

Официальные оппоненты:

Сучкова Елена Владимировна доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней с курсом сестринского дела

Павлов Александр Игоревич доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «3 Центральный военный клинический госпиталь им. А.А. Вишневского» Министерства обороны Российской Федерации, начальник центра гастроэнтерологии и гепатологии.

Ведущая организация: Казанская государственная медицинская академия - филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « » ____ 2019 в часов на заседании диссертационного совета Д 208.067.03 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26 и на сайтах www.psmu.ru, vak.minobrnauki.gov.ru/main

Автореферат разослан « » 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Баландина Ирина Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Несмотря на достигнутый успех в диагностических и терапевтических методах управления хроническими заболеваниями печени, цирроз печени (ЦП) остаётся значимой медико-социальной и экономической проблемой во всем мире (Барамзина С.В., 2013; Сандлер Ю.Г., 2014). Высокая распространенность заболевания, поздняя диагностика, недостаточная эффективность методов лечения и профилактики, высокий риск осложнений приводят к увеличению количества больных с ЦП (Дядык А.И. с соавт., Ивашкин В.Т. с соавт., 2013). В странах с высоким уровнем жизни смертность от ЦП стоит на шестом месте (Назыров Ф.Г. с соавт., 2013; Силачева М.В. с соавт., 2015). Особенно отличаются тяжелым течением алкогольно – вирусные ЦП, которые чаще трансформируются в гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) (Сапронова Н.Г. с соавт., 2013; Bruix J. et al., 2016).

По современным представлениям в основе патогенеза ЦП стоит цирроз-ассоциированная иммунная дисфункция, включающая множество механизмов, приводящих к иммунному дефициту и системному воспалению (Albillos A. et al., Sipeki N., 2014; Dirchwolf M., 2016).

Ключевая роль в развитии воспаления принадлежит цитокинам, как основным регуляторам межклеточных взаимодействий (Останин А.А. с соавт., 2015). Выработка цитокинов определяется многими факторами, в том числе и генетическими. Изучение влияния мутации в генах различных цитокинов на формирование воспалительного ответа и различных диапазон клинических форм, могут помочь прогнозировать риск развития заболевания (Боженко Е.Н. с соавт., 2013).

К настоящему времени отсутствуют специфические лабораторные тесты, позволяющие осуществлять мониторинг течения заболевания и прогнозировать его исход (Albillos A. et al., 2014). Пока еще не нашли практического применения недавно изученные прямые серологические маркёры фиброза (Базарный В.В. с соавт., 2013; Шептулина А.В. с соавт. 2015). Использование различных шкал и индексов не решают все проблемы ведения пациентов и не всегда определяют стадию ЦП (Базарный В.В., Гаренских Н.В., 2013). Нет точных критериев,

позволяющих оценивать скорость прогрессирования цирроза (Базарный В.В. и Гаренских Н.В., 2013; Булатова И.А. с соавт., 2015; Шептулина А.В. с соавт., 2015). Инструментальные методы диагностики не всегда позволяют судить о выраженности ЦП особенно на ранних стадиях заболевания (Ивашкин В.Т. с соавт, 2013; Левитан Б.Н. с соавт., 2017).

Перечисленные причины определяют актуальность проведения диссертационной работы по изучению этиологических, клинко-патогенетических, лабораторных и генетических особенностей ЦП.

Степень разработанности темы исследования. Цирроз печени является проблемой клинической медицины, поскольку наиболее часто страдают лица трудоспособного возраста, с высоким процентом инвалидизации и смертности. В течение последнего времени изучению воспалительного статуса больных ЦП посвящено не так много работ, результаты в них разрозненны и неоднозначны, не встречаются сведения, раскрывающие взаимосвязь между клиническими признаками, генетическими особенностями и лабораторными тестами, не уточнены возможности применения расчетных шкал и индексов при этой патологии, нет критериев, позволяющих оценить скорость развития цирроза.

Цель исследования – оценить влияние патогенетически значимых молекул (цитокинов, факторов роста и регенерации) и генной вариабельности изучаемых показателей на выраженность клинических проявлений в зависимости от этиологии, класса тяжести цирроза печени и возможность оценки риска развития ЦП.

Задачи исследования:

1. Оценить клинко-лабораторные особенности при ЦП в зависимости от этиологии и класса тяжести заболевания. Выявить взаимосвязи клинических проявлений ЦП и патогенетически значимых лабораторных маркеров поражения печени и класса тяжести.
2. Исследовать уровни сывороточных концентраций про- и противовоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли альфа- α (TNF- α), интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-6 (IL-6), интерферона- γ (IFN- γ), факторов роста: васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-

CSF), а также маркера патологической регенерации гепатоцитов АФП у больных ЦП вирусной, алкогольной и смешанной этиологии и установить их диагностическую значимость для оценки тяжести поражения печени.

3. Для стратификации стадий ЦП определить диагностическую чувствительность и специфичность цитокинов TNF-а, IL-6, VEGF и G-CSF и их пороговые концентрации, оценить значимость АФП для прогрессирования и дифференциации класса тяжести заболевания.
4. Для дифференциации класса тяжести заболевания выявить новые возможности использования лабораторных индексов APRI и MELD при ЦП.
5. Выявить различия полиморфизма генов *TNF (G4682A)*, *IL-6 (C174G)* и *VEGFA (G-634C)* у пациентов с ЦП и в популяции здоровых лиц Пермского края и оценить их взаимосвязи с риском развития заболевания, этиологией заболевания, полом пациентов и тяжестью поражения печени.

Научная новизна. Определены клинико-патогенетические и генетические особенности при ЦП в зависимости от пола, этиологии и класса тяжести цирроза и их взаимосвязи с клиническими проявлениями.

Впервые определены пороговые значения для IL-6, а также уточнены пороговые концентрации уровней цитокинов (TNF-а, VEGF, G-CSF) для дифференциации класса тяжести заболевания. Установлена диагностическая значимость АФП для дифференциации декомпенсированной стадии (класс С) при ЦП.

Уточнены возможности использования расчётных индексов APRI и MELD для стратификации классов тяжести поражения печени при циррозе.

Изучена роль полиморфизмов генов регуляторных молекул *TNF (G4682A)*, *IL-6 (C174G)* и *VEGFA (G-634C)* как факторов риска развития ЦП.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенного исследования определены клинико-патогенетические особенности при ЦП различного генеза и различных классов тяжести.

Продемонстрирована роль активности воспаления в прогрессировании ЦП.

Разработан алгоритм диагностики ЦП, с помощью которого можно установить класс тяжести поражения печени и риск развития цирроза.

Рассчитаны пороговые значения TNF-а, IL-6, VEGF, G-CSF и установлена диагностическая значимость АФП для оценки класса тяжести ЦП.

Показано, что применение индексов APRI и MELD повышает точность дифференциации классов ЦП.

Выявление однонуклеотидного полиморфизма генов *TNF* (*G4682A*), интерлейкина-6 *IL-6* (*C174G*) и *VEGFA* (*G-634C*) позволяют в целом прогнозировать формирование ЦП, при этом полиморфизм *TNF* (*G4682A*) имеет ассоциацию с высоким риском развития алкогольного ЦП.

Положения, выносимые на защиту

1. Основные клинические проявления ЦП отражают тяжесть поражения печени и имеют взаимосвязи с патогенетически значимыми лабораторными маркерами не зависимо от этиологии заболевания и гендерных особенностей.

2. Для диагностики класса тяжести цирроза может эффективно использоваться определение уровней цитокинов TNF-а, IL-6, факторов роста VEGF, G-CSF и АФП, отражающих наличие воспаления, неоангиогенеза и патологической регенерации в печени при ЦП вне зависимости от этиологии заболевания.

3. Для дифференциации класса тяжести ЦП уточнена возможность использования лабораторных индексов APRI и MELD независимо от этиологии процесса.

4. Риск развития алкогольного ЦП отражает полиморфизм гена *TNF* (*G4682A*) (*rs1800629*) в виде преобладания минорной аллели и гетерозиготы. Однонуклеотидный полиморфизм генов *IL-6* (*C174G*) (*rs1800795*) и *VEGF* (*G-634C*) (*rs2010963*) в виде преобладания гетерозиготного генотипа также имеют значение как факторы риска развития ЦП вне зависимости от этиологии.

Внедрение результатов исследования. Теоретические положения и практические результаты диссертационного исследования применяются в учебном процессе кафедр инфекционных болезней, факультетской терапии №1 с курсом физиотерапии ФДПО, факультетской терапии № 2 и профессиональных болезней с курсом профболезней ФДПО, клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России. Результаты исследования внедрены в

работу ГБУЗ ПК «Городская клиническая больница № 2 имени Ф. Х. Граля», ООО «Центр профессиональной медицины», ООО «Профессорская клиника», ООО «МедЛабЭкспресс» г. Перми.

Апробация работы и публикации. Результаты исследования доложены на Межрегиональной научно-практической конференции «Использование новых технологий и инновационных решений в практике клинико-диагностических лабораторий» (Пермь, 2017), IV конференции иммунологов Урала (Челябинск, 2017), Краевой научно-практической конференции «Использование новых технологий и инновационных решений в практике клинико-диагностических лабораторий» (Пермь, 2018), форуме специалистов лабораторной медицины Пермского края «Современные подходы к организации лабораторной службы, профессиональные стандарты и образование, перспективные технологии в медицинской практике» (Пермь, 2019).

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 7 – в рекомендуемых ВАК изданиях (1 – в журнале, входящем в базу Scopus). Зарегистрирован патент на изобретение «Способ диагностики степени тяжести цирроза печени смешанной этиологии» № 2632101 от 02.10.2017 г. по заявке № 2016117613 от 04.05.2016г. Бюллетень №28.

Структура и объем диссертации. Диссертация представляет собой рукопись на русском языке объемом 146 страниц, состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, приложения и списка литературы, содержащего 122 источник, из которых 60 отечественных и 62 зарубежных. Работа иллюстрирована 28 таблицами и 28 рисунками.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинской декларацией на проведение научного исследования с участием человека (Хельсинки, Финляндия 1964 г.) и одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России (разрешение этического комитета от 29.08.2018 г.).

Личный вклад автора в выполнении исследования. Автор лично принимал участие в планировании, организации и реализации программы обследования пациентов, формулировании цели и задач, анализе научных публикаций по теме диссертации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 86 пациентов, поступивших на стационарное лечение в Пермскую краевую инфекционную больницу, в городскую клиническую больницу №2 имени Ф.Х. Граля и клиническую медико-санитарную часть №1 г. Перми, давших добровольное информированное согласие на включение в исследование.

Средний возраст больных составил $53 \pm 13,01$ года. Средняя длительность заболевания от момента постановки диагноза ЦП составила $6 \pm 3,49$ лет. По гендерному признаку пациенты распределялись следующим образом: 44 (50,8%) мужчин и 42 (47,2%) женщины. Группа сравнения была сформирована из 70 практически здоровых лиц средним возрастом $47 \pm 10,1$ лет, из них 38 женщин и 32 мужчины.

Дизайн исследования представлен следующими этапами (рис.1):

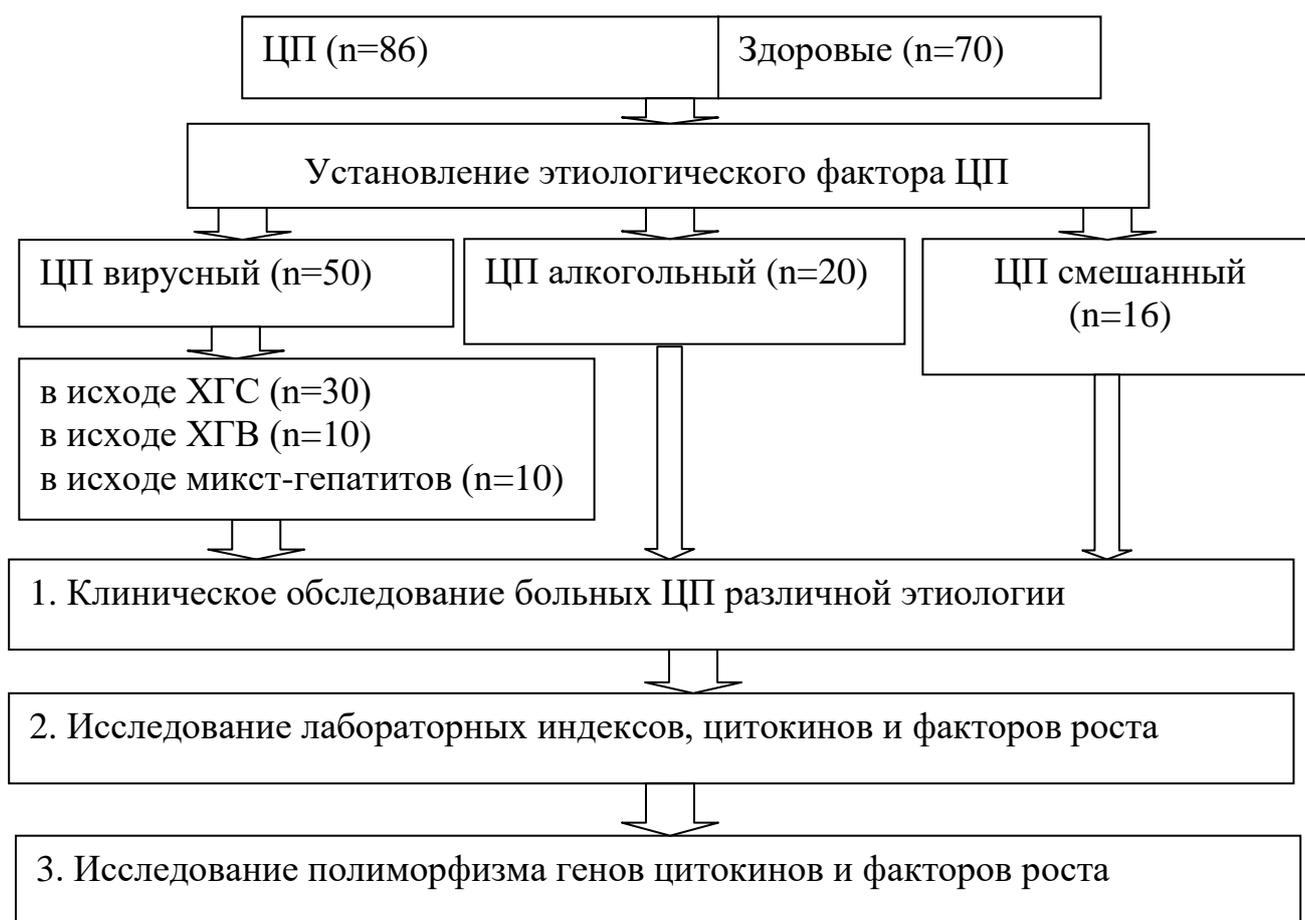


Рисунок 1 – Дизайн исследования

По этиологическому признаку пациенты были распределены на три группы: первую группу составили пациенты с вирусным ЦП – 58,1%, вторую группу с алкогольным ЦП – 23,2% и третью группу составили со смешанным ЦП – 18,7%. Группу с вирусным ЦП мы подразделили на три подгруппы: первая подгруппа состояла из 60% в исходе гепатита С, вторая – 20% в исходе гепатита В и третья группа 20% в исходе микст-гепатитов. Группы были сопоставимы по полу, возрасту и стадии заболевания.

Функциональный класс А (по шкале Чайлд-Пью) был выявлен у 25 (29%) больных, у 29 (32%) пациентов — класс В и у 32 (39%) — класс С.

Клинический диагноз ЦП устанавливался в соответствии с рекомендациями европейской и российской ассоциации по изучению печени (EASL Clinical practice guidelines, 2011; В.Т. Ивашкин и соавторами, 2013). Проведен опрос жалоб и физикальное обследование пациентов. Оценивали адекватность поведения. Выполнена пальпация и перкуссия печени и селезенки. При ультразвуковом методе исследования у пациентов с ЦП были выявлены признаки портальной гипертензии.

Алкогольный генез ЦП подтверждался на основании клинико-амнестических данных, визуальных признаков и тестирования по опроснику CAGE (скрининговая методика оценки хронической алкогольной интоксикации) (Павлов А. И. с соавт., 2010; Toric A., 2013).

Лабораторное обследование включало исследование образцов крови пациентов, поступивших в стационар и не получавших противовирусную терапию. Вирусная этиология ЦП верифицировалась серологическими и генетическими маркерами вирусных гепатитов. Определение биохимических показателей проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Architect с4000 реактивами фирмы Abbott (США). Подсчёт тромбоцитов и эритроцитов выполняли на гематологическом анализаторе Medonic M20 (Швеция). Количественное содержание цитокинов в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) на планшетном фотометре Stat Fax 2100 (США).

Аmplификацию полиморфных вариантов генов проводили аллель-специфической полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени

(ПЦР-РВ) с использованием наборов "SNP-Скрин" ЗАО «Синтол» (г. Москва) на приборе «CFX-96» Bio-Rad (США).

Применяли расчётные индексы: APRI (Aspartate-aminotransferase-to-Platelet Ratio Index) по формуле $APRI = (ACT / (\text{верхний предел } ACT)) * 100 / \text{тромбоциты} (10^9/\text{л})$ (C-T Wai, 2003) и MELD (Model for End-Stage Liver Disease) по формуле $MELD = 11,2 \times \ln(\text{МНО}) + 9,57 \times \ln(\text{креатинин, мг/дл}) + 3,78 \times \ln(\text{билирубин, мг/дл}) + 6,43$ (Flodén A. Et. al., 2007). Для расчёта значений индекса использовали калькуляцию (источник www.mayoclinic.org/gi-rst/mayomodel15.html).

Использовали шкалу Чайлд-Пью, основываясь на лабораторные параметры: ПТИ, билирубин и альбумин, и субъективную оценку: наличия энцефалопатии и асцита, пациенты были распределены на три класса (R. N. Pugh, 1976).

Обработку полученных данных выполняли с помощью компьютерных программ «STATISTICA 6.0», встроенного пакета «Microsoft Excel 2010» и пакета прикладных электронных таблиц «Stat-2000» (В.С. Шелудько, 2001).

Для проверки гипотезы использовали непараметрические методы статистики. Результаты описывали в виде медианы и перцентилей, обозначаемых как Me (25; 75%). Для определения статистической значимости различий количественных признаков применяли критерии Манна-Уитни (Mann-Whitney) и Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis). Качественные отличия признаков выявлены методом χ^2 с помощью критерия Фишера. Взаимосвязь между параметрами оценивали с помощью коэффициента Спирмена (r_s). Сравнение номинальных данных проводили при помощи χ^2 Пирсона, оценивая значимость различий между фактическим количеством и качественными характеристиками выборки, попадающих в каждую категорию (Шелудько В.С., 2016).

Для анализа генетических тестов применяли равновесие Харди-Вайнберга. Различия в двух популяциях рассчитывали по отношению шансов (OR) с использованием унифицированной программы «SNP Stats» (http://gen-exp.ru/calculator_or.php).

Для оценки диагностической значимости и пороговых показателей проводили ROC-анализ и расчет отношения шансов (OR) по методике Власова В.В. (1988).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая картина пациентов характеризовалась наиболее выраженными синдромами: асцитическим, диспепсическим, холестатическим, печечно-клеточной недостаточности, воспалительным и синдромом портальной гипертензии (таблица 1). Несмотря на схожесть процентного соотношения встречаемости симптомов, при алкогольном ЦП чаще отмечались воспалительные реакции и диспепсический синдром. При этом наиболее выраженные клинические синдромы имели место при смешанном генезе ЦП. Для вирусного и смешанного цирроза характерно более высокая частота встречаемости выявленной печеночной энцефалопатии (до 70%), по сравнению с алкогольным циррозом (до 55%).

Таблица 1 – Частота клинических синдромов при ЦП вирусной, алкогольной и смешанной этиологии, (%)

Клинические синдромы	Вирусный ЦП (n=50)	Алкогольный ЦП (n=20)	Смешанный ЦП (n=16)	<i>p</i>
Астеновегетативный	90	80	95	0,9
Диспепсический	78	98	98	0,3
Болевой	44	48	55	0,5
Воспалительный	60	78	78	0,3
Гипотрофический	20	25	33	0,4
«Печеночные» знаки	60	55	76	0,5
Желтуха	80	88	89	0,4
Геморрагический	35	40	65	0,2
Асцит	45	55	55	0,5
Портальная гипертензия	100	100	100	1,0
Печеночной энцефалопатии	60	55	70	0,8
Гепатомегалия	55	67	68	0,5
Гепаторенальный	5	6	8	0,3

Среди вирусных ЦП в исходах вирусных гепатитов В, С и микст-гепатитов значимых отличий не выявлено.

При анализе зависимости между основными клиническими симптомами у больных с ЦП и лабораторными тестами выявлена выраженная взаимосвязь между шкалой MELD и иктеричностью/ субиктеричностью кожных покровов и склер ($Ki=0,849$, $p=0,004$) (таблица 2). Отеки нижних конечностей и даже пастозность голеней также демонстрировали выраженную зависимость с показателем MELD ($p=0,027$ и $p=0,036$). IL-6 продемонстрировал умеренные

взаимосвязи с заторможенностью и гепатоцеллюлярной недостаточностью ($Ki=0,673$ и $Ki=0,607$ соответственно).

Таблица 2 – Взаимосвязь основных клинических симптомов у больных с ЦП с лабораторными тестами

Клинические симптомы/лабораторные тесты	Ki	p
Иктеричность кожи/MELD	0,849	0,004
Субиктеричность склер/MELD	0,849	0,004
Отеки нижних конечностей/ MELD	0,730	0,027
Пастозность голеней/ MELD	0,707	0,036
IL-1 β /снижение памяти	0,780	0,015
IL-6/заторможенность	0,673	0,042
IL-6/гепатоцеллюлярная недостаточность	0,607	0,034
TNF- α /гепатомегалия	0,567	0,043
IL-6/гепатомегалия	0,567	0,043

Примечание: Ki - коэффициент информативности: p – значимость зависимости.

На более ранних стадиях заболевания отмечались больше общие неспецифические симптомы. В стадии выраженных клинических проявлений вышеперечисленные проявления нарастали (таблица 3).

Таблица 3 – Частота клинических проявлений по классам тяжести ЦП, %

Клинические синдромы	Класс А (n=25)	Класс В (n=29)	Класс С (n=32)	p
Астеновегетативный	80	90	100	0,8
Диспепсический	60	80	100	0,2
Болевой	40	68	77	0,05
Гипотрофический	50	55	86	0,04
«Печеночные» знаки	33	53	100	0,03
Желтуха	40	70	89	0,05
Асцит	0	47	100	0,03
Портальная гипертензия	100	100	100	1,0
Печеночная энцефалопатия	18	56	89	0,04
Гепатомегалия	45	65	58	0,06

При анализе взаимосвязи класса тяжести ЦП с клиническими проявлениями выявлена сильная ассоциативная связь (таблица 4). По результатам биохимических исследований у всех пациентов с ЦП выявлены нарушения функциональных печеночных тестов, что подтвердило наличие лабораторных синдромов цитолиза, холестаза, воспаления, печеночно-клеточной недостаточности и повышенной регенерации гепатоцитов.

Таблица 4 – Коэффициент корреляции (r_s) между классом тяжести и клиническими признаками при ЦП

Показатели	r_s	p
Класс тяжести и портальная гипертензия /асцит	0,75	<0,001
Класс тяжести и желтуха	0,61	0,004
Класс тяжести и воспаление	0,75	<0,001
Класс тяжести и диспепсия	0,76	0,02
Класс тяжести и цитопения	0,78	<0,001
Класс тяжести и печеночная энцефалопатия	0,76	<0,001

По мере прогрессирования заболевания механизмы патологической регенерации в печени нарастают, что подтверждается повышением уровня АФП в сыворотке крови у больных ЦП. У пациентов с классом тяжести В маркер имел показания 2,85 (2,13 – 5,93) МЕ/мл, но без значимых отличий от класса тяжести А – 2,39 (1,52 – 3,51) МЕ/мл ($p=0,21$). При этом сывороточная концентрация данного маркера у пациентов с классом тяжести С равнялась 4,41 (3,16 – 11,9) МЕ/мл, что было достоверно выше, чем в группах с классом А и В ($p=0,01$ и $p=0,03$, соответственно).

При корреляционном анализе в группе с ЦП обнаружены достоверные прямые взаимосвязи класса тяжести заболевания с АСТ ($r_s=0,37$; $p=0,001$), билирубином ($r_s = 0,41$; $p<0,001$), ЩФ ($r_s= 0,22$; $p=0,04$), СРБ ($r_s =0,42$; $p=0,001$), γ -глобулином ($r_s = 0,31$; $p=0,02$), АФП ($r_s=0,35$; $p=0,004$), а также обратные взаимосвязи с концентрацией общего белка ($r_s = -0,25$; $p=0,03$) и альбумина ($r_s = -0,69$; $p<0,001$).

По результатам ИФА у больных ЦП в сравнении с группой контроля было установлено повышение сывороточных концентраций провоспалительных цитокинов TNF- α в 3,5 раза ($p=0,001$) и IL-6 в 36 раз ($p<0,001$), VEGF 2,3 раза ($p<0,001$) и G-CSF в 1,3 раза ($p=0,01$) (таблица 5). По этиологическому признаку значимых различий уровня цитокинов не выявлено.

Результаты анализа зависимости показателей воспаления с лабораторными тестами выявили статистически значимые корреляции концентраций цитокинов TNF- α , IL-6 и VEGF со всеми значимыми тестами, а также взаимосвязь IL-6 и VEGF с индексом APRI ($p<0,001$ и $p=0,01$).

Таблица 5 – Уровень цитокинов в обследуемых группах ЦП и в группе контроля, Ме (25-75%)

Показатель, пг/мл	Группа контроля (n=29)	Группы больных с ЦП (n=86)	ЦП вирусный (n=50)	ЦП алкогольный (n=20)	ЦП смешанный (n=16)
TNF- α	0,4(0,2-1,2)	3,6 (2,4-4,7)*	3,6(2,2-5,4)	3,5(2,6-4,2)	3,2(2,6-3,7)
IL-1 β	3,2(3-3,3)	2,7(2,4-3,2)	2,93(2,6-3,1)	2,4(2,2-2,8)	2,8(2,3-3,07)
IL-4	1,3(1-1,5)	1,6(1,3-1,9)	1,7(1,2-2,3)	1,5(1,2-1,87)	1,83(1,5-1,9)
IL-6	0,6(0,2-2,1)	22(8,6-43,7)*	35,7(34,4-69,72)	37(23,1-78,1)	29,3(7-64,1)
IFN- γ	9,6(9-9,8)	9,7(8,4-11,1)	9,95(9,5-10,8)	9,2(8,7-9,9)	9,8(9,5-10,4)
VEGF	86,7(9,6-187,3)	203,6(94,6-478)*	198,3(75,8-335,6)	262,9(156,2-600,4)	151,5(77,9-313,4)
G-CSF	8,3(6,2-13,3)	10,8(5-57)*	12,7(5,4-53)	8,9(5-53,1)	8,55(3,75-37,4)

Уровни медианы концентрации цитокинов по мере прогрессирования ЦП значительно повышались. Критерий Краскела-Уоллиса показал достоверность результатов выработки IL-6 ($p<0,001$), TNF- α ($p=0,01$), VEGF($p<0,001$) и G-CSF ($p=0,04$) (таблица 6). При попарном сравнении групп с помощью критерия Манна-Уитни уровень IL-6 у пациентов с классом В был выше в 3 раза, чем при классе А и ($p<0,001$), а также имел достоверные различия у больных с классом С ($p<0,001$) и уровень медианы вырос ещё в 3,2 раза.

Таблица 6 – Цитокиновый статус больных ЦП по классам тяжести, Ме (25-75%)

Параметр, пг/мл	Группа контроля (n=29)	ЦП класс А (n=25)	ЦП класс В (n=29)	ЦП класс С (n=32)	p
TNF- α	0,4(0,2-1,2)	2,7 (2,5-3,2)	3,62(3,0-4,6)	3,9(2,9-9,7)	0,01
IL-1 β	3,2(3-3,4)	2,7 (2,4-2,9)	2,95(2,4-3,25)	2,7(2,3-2,9)	0,42
IL-4	1,3(1-1,46)	1,6 (1,3-2,3)	1,8(1,7-2,3)	1,4(1,2-1,8)	0,06
IL-6	0,6(0,2-2,1)	6,6 (4-9,6)	19,8(12,3-24)	57,8(33,1-137)	<0,001
IFN- γ	9,5(9-9,8)	9,4(9,2-9,9)	10(9,45-10,45)	9,6(8,8-10,2)	0,3
VEGF	86,65 (6,6-177,3)	110,85 (77,5-245,8)	125,5 (57,1-211,7)	376,85 (210,2-635)	<0,001
G-CSF	8,3 (6,2-13,3)	6,1 (5,0-12,8)	9,4 (4,95-24,45)	24,8 (5-64,9)	0,04

Концентрация VEGF в 3 раза повышалась на стадии тяжелого цирроза ($p<0,001$). Концентрация G-CSF в 2,7 раза повышалась при классе С ($p=0,04$).

Провоспалительный цитокин TNF- α значительно увеличивался при переходе в класс тяжести В заболевания ($p=0,01$).

Наиболее сильная корреляционная связь выявлена между классом тяжести ЦП и IL-6 ($r_s=0,75$; $p<0,001$). Увеличение концентрации VEGF ($r_s=0,45$; $p<0,001$), G-CSF ($r_s=0,3$; $p=0,02$) и TNF- α ($r_s=0,31$; $p=0,004$) на стадии декомпенсации связаны с активацией процессов ангиогенеза и воспаления.

При использовании расчётных индексов APRI и MELD в группе ЦП обнаружено статистически значимое повышение значений в 2 раза в сравнении с группой здоровых лиц ($p<0,001$ и $p<0,05$).

При сравнительной оценке медианы значений расчётных индексов APRI и MELD у больных ЦП вирусной, алкогольной и смешанной этиологии достоверных различий не обнаружено.

По мере нарастания тяжести заболевания значения APRI увеличивались и имели статистически значимые различия. Так в группе с классом А значения медианы составили 0,79 (0,6-1,05), с классом В – 1,65 (1,13-2,2), с классом С – 2,5 (2,13-2,87) (рисунок 2).

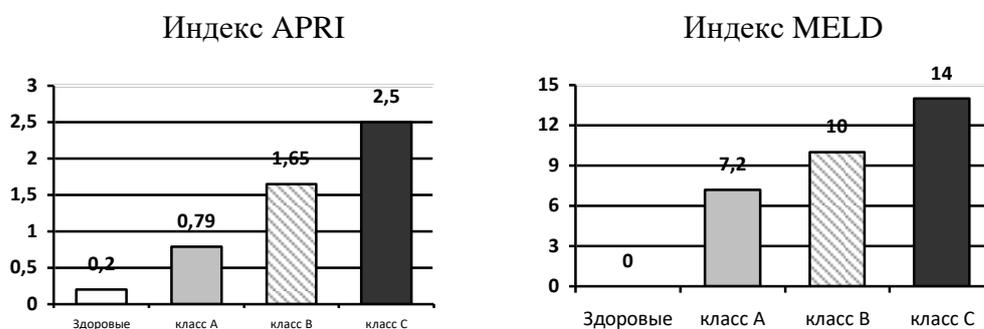


Рисунок 2 – Класс тяжести ЦП и значения медианы индексов APRI и MELD

Значения расчетного индекса MELD составили при классе А -7,2 (6-9), классе В - 10 (8-11), а при классе С - 14 (12-18). Найдена прямая взаимосвязь индекса APRI и MELD с классом тяжести ЦП по шкале Чайлд-Пью ($r_s = 0,71$; $p<0,001$ и $r_s=0,64$; $p=0,005$, соответственно).

По результатам ROC-анализа площадь под графическим изображением индекса APRI для дифференциации класса тяжести ЦП составила $AUC 0,927 \pm 0,05$ (доверительный интервал 0,81-0,98), $p<0,001$ (рисунок 3). Индекс APRI позволяет диагностировать класс тяжести А при ЦП с чувствительностью – 89,7% и

специфичностью – 91,7%. менее 1,12. При значении APRI более 1,12 и менее или равном 1,78 отражает класс тяжести В, более 1,78 – класс тяжести С цирроза с чувствительностью 90,9% и специфичностью 91,7%. Специфичность и чувствительность расчетного индекса APRI для группы больных с ЦП оказалась выше, чем для группы пациентов с ХГС (специфичность-72%, чувствительность - 77%) по данным других авторов (El Serafy, M.A.,2017).

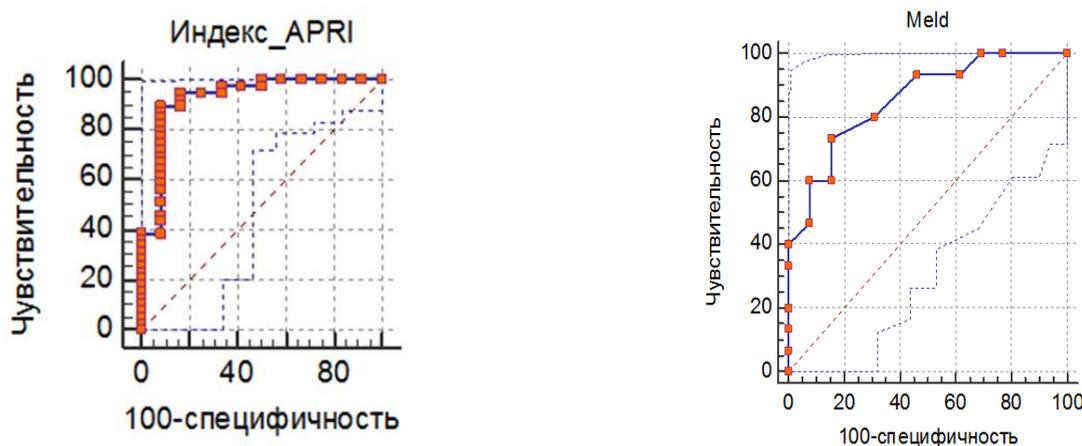


Рисунок 3 – ROC-кривые индексов APRI и MELD

Площадь ROC-кривой индекса MELD для дифференциации класса тяжести А и В ЦП от класса тяжести С составила $AUC\ 0,856\pm 0,06$ (доверительный интервал 0,67-0,95), $p<0,001$ с чувствительностью 73,3% и специфичностью 84,6% (рисунок 3). Точка разделения между классом тяжести А и В при ЦП от класса тяжести С равна 11.

Также нами в качестве маркеров для стратификации ЦП были рассмотрены цитокины IL-6, TNF- α , VEGF и G-CSF и рассчитаны их пороговые концентрации. Так площадь ROC-кривой IL-6 для дифференциации класса А и В при ЦП составила $AUC\ 0,902\pm 0,01$ с доверительным интервалом 0,81-0,96, что является очень хорошим качеством модели. Индекс Юдена для данного показателя составил 0,73 с оптимальным пороговым показателем 12,7 пг/мл при высокой чувствительности и специфичности (85,7% и 87,3%). Для дифференциации класса В и класса С при ЦП площадь ROC-кривой составила $AUC\ 0,88\pm 0,04$ с доверительным интервалом 0,76-0,95 и пороговой концентрацией 26,2 пг/мл.

При анализе графического изображения TNF- α для стратификации класса А и класса В площадь ROC-кривой составила $AUC\ 0,72\pm 0,07$ с хорошим

диагностическим качеством модели. Индекс Юдена для данного показателя составил 0,41 с пороговым показателем 3 пг/мл с чувствительностью 65% и специфичностью 76,9% .

В качестве дополнительных маркеров воспаления мы предлагаем использовать определение сывороточных уровней VEGF и G-CSF. Их пороговые значения, для VEGF более 169,4 пг/мл и для G-CSF более 16,7 пг/мл с чувствительностью 65-87% и специфичностью 61,5-92,3%, позволяют дифференцировать класс В и С .

Наиболее информативными показателями являются расчётный индекс APRI и IL-6, которые эффективно могут заменять комплекс параметров, входящих в классификацию Чайлд-Пью. Для скрининга ЦП наиболее полезен расчётный индекс APRI. Провоспалительный цитокин IL-6, имеющий большой размах числовых значений, может применяться в мониторинге лечения больных с ЦП. В качестве потенциально дополнительных критериев для оценки выраженности воспалительной реакции в различных интегральных схемах можно определять сывороточные концентрации TNF- α , VEGF и G-CSF совместно с другими показателями воспаления.

С целью изучения роли генетических маркёров в развитии цирроза печени нами был проанализирован однонуклеотидный полиморфизм генов фактора некроза опухоли-альфа *TNF(G4682A)* и васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA (G-634C)* у 126 человек (80 доноров без хронических заболеваний печени и 46 пациентов с ЦП различной этиологии), а также однонуклеотидную замену в гене интерлейкина-6 *IL-6 (C174G)* у 149 человек (80 здоровых лиц без хронических заболеваний печени и 69 пациентов с ЦП).

Анализ частоты генотипов и аллелей *TNF (G4682A)* у лиц ЦП выявил статистические значимые различия по группе здоровых лиц. Значения частоты мутации определены в 1,5 раза чаще ($\chi^2=4,22$; $p=0,04$). При этом гетерозигота GA и минорная аллель A исследуемого гена у пациентов с ЦП регистрировались чаще в 58,8% и 6,5%, чем у группы сравнения - в 43,7% ($\chi^2=4,76,37$; $p=0,09$; OR=1,83) и 2,6% ($\chi^2=3,78$; $p=0,06$; OR=1,74) случаев соответственно. По результатам сравнения частот в группах вирусного и алкогольного ЦП генотип GG и аллель G встречались чаще в 53,85% и 76,92% случаев, что в 5,4 и в 1,6 раз превышало

частоту их обнаружения у пациентов с алкогольным циррозом (10% и 47,5%) при $p < 0,001$ и $p = 0,01$ соответственно. Распространенность патологической аллели А в данном локусе гена исследуемого цитокина напротив была выявлена значимо чаще у больных АЦП, чем у пациентов с ЦП в исходе вирусных гепатитов за счёт гомо- и гетерозиготного генотипа ($p < 0,001$ и $p = 0,01$ соответственно).

Частота гетерозиготного носительства *IL-6(C174G)* составляла 81,16% больных ЦП, чем в группе здоровых – 50% ($\chi^2 = 16,87$; $p < 0,001$; OR=4,31).

При сравнении встречаемости аллельных вариантов гена *VEGFA (G-634C)* в когорте здоровых лиц преобладал генотип GG в 32,5%, который у больных ЦП встречался значимо реже в 13,04% случаев ($\chi^2 = 9,21$; $p = 0,01$; OR=0,31). При этом генотип GC достоверно чаще в 1,8 раза встречался у больных ЦП, чем в группе здоровых лиц (76,1% и 48,7%) ($\chi^2 = 9,21$; $p = 0,01$; OR=3,34) по общей модели наследования.

Значимых различий частоты встречаемости генотипов в группах больных ЦП в зависимости от гендерных особенностей и тяжести заболевания не обнаружено.

Однако с помощью бальной оценки получены результаты, указывающие на разную связь заболевания с генетическими особенностями. В группе с алкогольным циррозом, в 75% случаев обнаруживались лица с баллом 3 и в 15% - с баллом 4, а у пациентов с вирусным ЦП чаще отмечались баллы 1 и 2 (68,2%).

При анализе ассоциации между стадиями заболевания и частотой встречаемости аллельных вариантов генов полученные данные были сопоставимы между группами. Однако при корреляционном многофакторном анализе наличия зависимости между изучаемыми качественными признаками и функциональными тестами, обнаружена взаимосвязь полиморфизма *G-4682A* гена *TNF* со снижением уровня общего белка ($p = 0,017$) и гиперпродукцией АФП ($p = 0,04$), полиморфизма гена *IL-6 (C174G)* со снижением количества тромбоцитов ($p = 0,049$), что свидетельствует о влиянии изученных полиморфизмов на тяжесть поражения печени. Полиморфизма гена *VEGFA(G-634C)* имел взаимосвязь с увеличением выработки TNF- α ($p = 0,04$) и АФП ($p = 0,04$), что вероятно доказывает сочетанное влияние на активацию процессов воспаления и механизмов патологической регенерации в печени. Генетических ассоциации полиморфизма

генов значимых молекул с содержанием в сыворотке крови соответствующих цитокинов нами не выявлено.

На основании всего вышеизложенного, мы предлагаем **алгоритм лабораторных тестов**, который позволяет оценить класс тяжести ЦП и наличие полиморфизма генов патогенетически значимых цитокинов (рисунок 4).

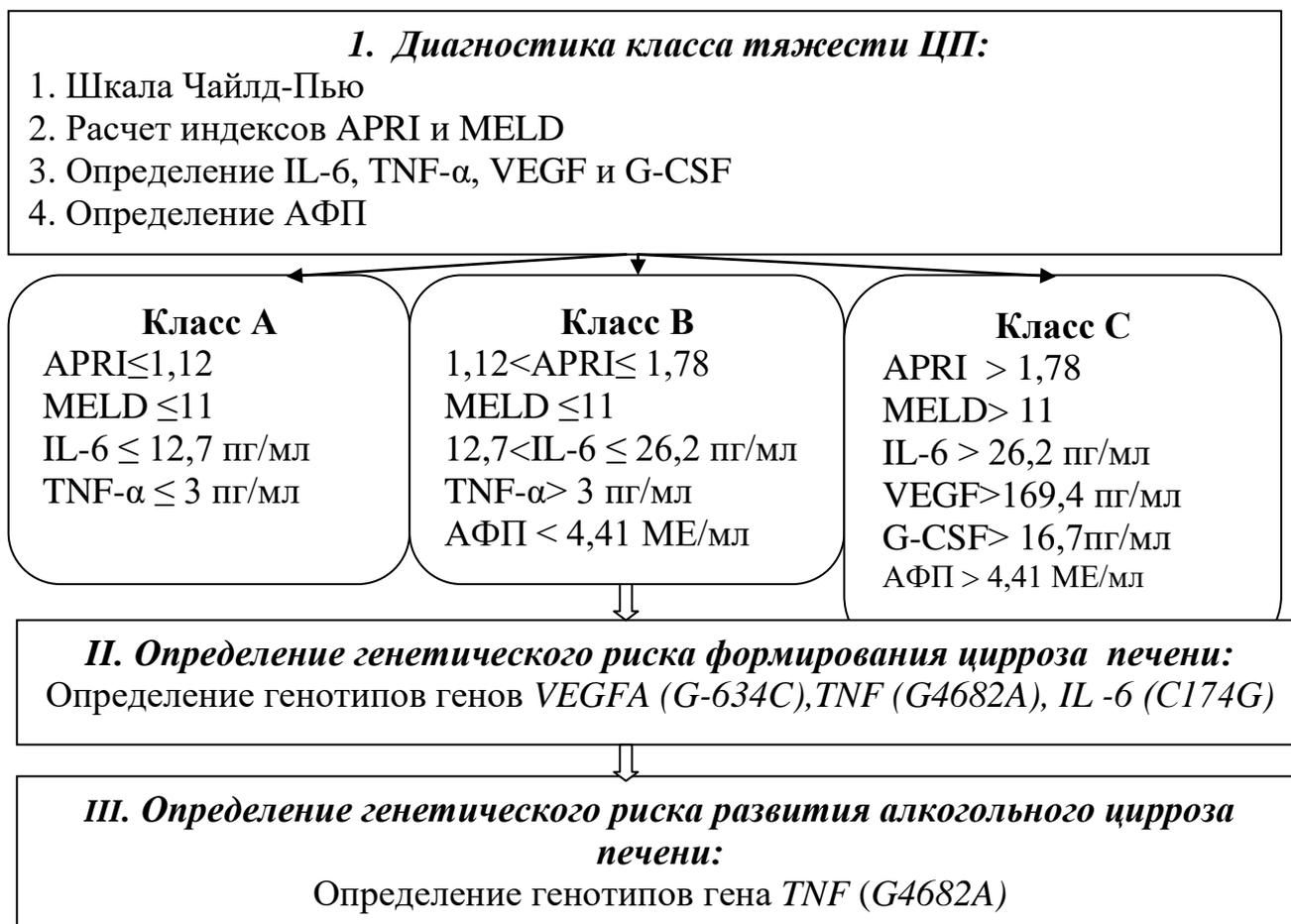


Рисунок 4 – Алгоритм лабораторных тестов для диагностики цирроза печени

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с циррозом печени клинические особенности отражают тяжесть поражения печени, не зависят от этиологического фактора, без существенных различий по гендерному признаку и взаимосвязаны с патогенетически значимыми молекулами заболевания.
2. Цирроз печени различной этиологии сопровождается активной выработкой провоспалительных цитокинов, что патогенетически обуславливает прогрессирование заболевания.
3. Уровни концентраций интерлейкина-6, фактора некроза опухоли-альфа, васкулоэндотелиального фактора роста, гранулоцитарного

колониестимулирующего фактора и альфафетопротеина позволяют стратифицировать классы тяжести цирроза печени.

4. У пациентов с циррозом печени расчетные индексы APRI и MELD позволяют дифференцировать классы тяжести заболевания независимо от этиологии процесса.
5. Молекулярно-генетические особенности полиморфизма генов *VEGFA* (*G-634C*), *IL-6* (*C174G*) и *TNF* (*G4682A*) имеют ассоциацию с возникновением цирроза печени. Генотип *G-4682A* гена *TNF* и выявление аллели риска *A* связаны с высоким риском формирования алкогольного цирроза печени.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для уточнения класса тяжести цирроза печени с учетом уровней провоспалительных цитокинов предложен диагностический алгоритм для пациентов с циррозом различной этиологии.

Использование сывороточных концентраций интерлейкина-6, фактора некроза опухоли - альфа, васкулоэндотелиального фактора роста, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и альфафетопротеина позволяет дифференцировать классы тяжести цирроза печени. Класс А верифицируется при значении IL-6 менее или равном 12,7 пг/мл, уровне TNF- α менее или равном 3 пг/мл. Класс В устанавливается при концентрации IL-6 более 12,7 пг/мл и менее или равной 26,2 пг/мл, уровне TNF- α более 3 пг/мл. Класс тяжести С ЦП верифицируется при IL-6 более 26,2 пг/мл, уровне VEGF более 169,4 пг/мл и концентрации G-CSF более 16,7 пг/мл. При значении уровня АФП в сыворотке крови менее 4,41 МЕ/мл диагностируют компенсированный и субкомпенсированный ЦП (классы А и В), более 4,41 диагностируют класс С.

2. При ЦП расчёт индекса APRI позволяет дифференцировать классы тяжести цирроза печени. При значении индекса до 1,12 включительно диагностируют класс А, индекс APRI в интервале от 1,12 до 1,78 включительно соответствует классу тяжести В при ЦП, индекс более 1,78 верифицирует декомпенсированный ЦП – класс тяжести С.

3. Для стратификации классов тяжести цирроза печени возможно применение расчетного индекса MELD. При значении индекса до 11 включительно диагностируют классы А и В, индекс MELD более 11 верифицирует класс С при ЦП.
4. Исследование полиморфизма генов фактора некроза опухоли-альфа *TNF* (*G4682A*), интерлейкина-6 *IL-6* (*C174G*) и васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA* (*G-634C*) следует использовать в качестве генетических маркеров, ассоциированных с повышенным риском развития цирроза печени. Полиморфизм *G-4682A* гена *TNF* рекомендуется применять для оценки риска развития алкогольного цирроза печени.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендуемых ВАК РФ

1. Булатова И.А., Щёктова А.П., Долгих О.В., Падучева С.В. Цитокиновый статус у больных циррозами печени разной этиологии // **Современные проблемы науки и образования**. – 2016. – № 3; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=24755>
2. Булатова И.А., Щёктова А.П., Долгих О.В., Падучева С.В., Кривцов А.В. Диагностическое значение фактора некроза опухоли альфа и полиморфизма его гена (*G4682A*) в прогрессировании цирроза печени // **Пермский медицинский журнал**. – 2016. – №4. – С. 49-54.
3. Падучева С.В. Диагностическое значение альфа-фетопротейна в прогрессировании циррозов печени разной этиологии // **Пермский медицинский журнал**. – 2016. – № 5. – С. 5-8.
4. Булатова И.А., Щёктова А.П., Падучева С.В., Долгих О.В., Кривцов А.В., Третьякова Ю.И. Значение интерлейкина-6 и полиморфизма его гена (*C174G*) при вирусных, алкогольных и смешанных циррозах печени // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2017. – Т.62. – №2. – С. 100-103 (**SCOPUS**).
5. Долгих О.В., Падучева С.В., Булатова И.А., Щёктова А.П. Особенности иммунологического ответа при циррозе печени в зависимости от степени его тяжести // **Российский иммунологический журнал**. – 2017. – №3. – С. 463-465.
6. Падучева С.В., Булатова И.А., Щёктова А.П., Третьякова Ю.И., Щёктова И.В. Возможности применения шкалы MELD для определения степени тяжести цирроза печени // **Пермский медицинский журнал**. – 2017. - №6. – С. 40-44.
7. Щёктова А.П., Булатова И.А., Падучева С.В. Клинико-диагностические проблемы фиброза/цирроза печени // **Пермский медицинский журнал**. – 2018. – №5. – С. 98-106.

Публикации в других изданиях

8. Булатова И.А., Щёктова А.П., Падучева С.В., Щёкотов В.В., Жижелев Е.В. Цитокины у больных циррозом печени вирусного и невирусного генеза // Информационный бюллетень «Новости Вектор-Бест». – 2015. – №1 (75). – С. 2-5.

9. Щёкотов В.В., Щёктова А.П., Булатова И.А., Кривцов А.В., Насибуллина Н.И., Падучева С.В. Фактор некроза опухоли-альфа, васкулоэндотелиальный фактор роста, гиалуроновая кислота и их гены при циррозе печени // Сборник тезисов. Материалы X национального конгресса терапевтов. – Москва, 2015. – С. 187.

10. Булатова И.А., Падучева С.В., Долгих О.В., Щёктова А.П. Профиль цитокинов у больных циррозом печени, вызванным вирусными гепатитами // Информационный бюллетень «Новости Вектор-Бест». – 2016. - №4 (82). – С. 12-14.

11. Булатова И.А., Падучева С.В., Щёктова А.П., Долгих О.В. Диагностическое значение интерлейкина-6 при циррозе печени // Информационный бюллетень «Новости Вектор-Бест». – 2017. – 3 (85). – С. 11-15.

12. Булатова И.А., Падучева С.В., Щёктова А.П., Щёктова И.В. Возможность использования индекса APRI для определения стадии цирроза печени // Информационный бюллетень «Новости Вектор-Бест». – 2018. – №2(88). – С. 11-15.

Патент

1. Булатова И.А., Долгих О.В., Падучева С.В., Щёктова А.П., Шелудько В.С. Способ диагностики степени тяжести цирроза печени смешанной этиологии. // Патент на изобретение № 2632101 от 02.10.2017 г. по заявке № 2016117613 от 04.05.2016г. Бюллетень №28.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСТ	аспартатаминотрансфераза
АФП	альфа-фетопротеин
СРБ	С - реактивный белок
МНО	международное нормализованное отношение.
ХГВ	хронический гепатит В
ХГС	хронический гепатит С
ХГ–микст	хронический гепатит В, С и Д
ЩФ	щелочная фосфатаза
G-CSF	гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (англ. Granulocyte colony-stimulating factor)
IFN – γ	интерферон γ (англ. interferon)
IL –1 β , 2	интерлейкин -1 β , 2 (англ.interleukin)
TNF- α	фактор некроза опухоли альфа (англ.tumor necrosis factor)
VEGF	васкулоэндотелиальный фактор роста (англ.Vascular endothelial growth factor)
VEGFA (G634C)	полиморфизм G634C гена VEGFA (rs2010963)
TNF (G4682A)	полиморфизм G4682A гена TNF (rs1800629)
IL-6 (C174G)	полиморфизм C-174G гена IL-6 (rs1800795)

Падучева Светлана Вячеславовна

**КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ.**

14.01.04 – Внутренние болезни

Автореферат

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

Отпечатано в ООО «ОТ и ДО»
614094, г. Пермь, ул. Овчинникова, 19
тел./факс (342) 224-47-47

Подписано в печать 28.08.2019 г.
Формат 60x84/16. Гарнитура Times New Roman.
Бумага офсетная. Усл. печ.л.1,4. Уч. изд.л.1,5
Тираж 100 экз. Заказ № 135.