

УРОВЕНЬ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ- α И ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА- β В СУБКЛИНИЧЕСКОЙ ФАЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С

Антонова Т.В.¹, Широнова Н.Л.¹, Гавришева Н.А.²,
Сесь Т.П.³

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,

¹ кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии,

² кафедра патофизиологии,

³ НМЦ по молекулярной медицине МЗиСР РФ, Санкт-Петербург

Резюме. Участие про- и противовоспалительных цитокинов в генезе воспаления и фиброза послужило основанием для исследования уровней TNF α и TGF β в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С (ХГС) в сопоставлении с характером и степенью патоморфологических изменений гепатобиоптата. Выявлено существенное повышение уровня TGF β в крови больных в субклинической фазе ХГС вне зависимости от активности воспаления и выраженности фиброза с тенденцией к более высоким показателям в случаях декомпенсации цирротической стадии заболевания. Неоднозначные изменения показателей TNF α у больных ХГС с тенденцией к более высокому уровню при выраженной гистологической активности и фиброзе печеночной ткани позволяют судить о возможной связи с разной степенью компенсаторно-приспособительных реакций.

Ключевые слова: гепатит С, фиброз, TNF α , TGF β .

Antonova T.V., Shironina N.L., Gavrishcheva N.A., Ses T.P.

TUMOR NECROSIS AND TRANSFORMING GROWTH FACTORS LEVEL IN SUB-CLINICAL STAGE OF CHRONIC HEPATITIS C

Abstract. Participation of pro- and anti-inflammatory cytokines in pathogenesis of inflammation and fibrosis served as a basis for studying TNF α and TGF β levels in blood serum from the patients with chronic hepatitis C (CHC), as compared with modes and degree of patho-morphological changes in liver biopsies. We have detected a sufficient increase in serum TGF β levels from patients in sub-clinical stage of CHC, independent on activity of the inflammatory process and expression of fibrosis, with a trend for its higher levels in cases of clinical decompensation at cirrhotic stage of the disease. Ambiguous changes of TNF α indexes in CHC patients with a tendency of higher levels in cases of higher histological activity and fibrosis of liver tissue allow us to consider a possible correlation with varying degree of compensatory and adaptive reactions. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 499-504)

Адрес для переписки:

Антонова Тамара Васильевна, профессор,
кафедра инфекционных болезней

СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8.

Тел.: (812) 499-71-36.

Введение

В настоящее время гепатит С привлекает к себе пристальное внимание исследователей и клиницистов, так как является одной из ведущих причин хронической патологии печени

и имеет существенные особенности патогенеза и клинических проявлений, определяющих трудности диагностики и терапии. В связи с особенностями возбудителя и его взаимодействия с макроорганизмом HCV-инфекция, как правило, сопровождается персистенцией вируса и формированием хронического инфекционного процесса. Отличительной чертой HCV-инфекции служит длительное субклиническое или малосимптомное течение, продолжительность которого может колебаться от нескольких лет до десятилетий.

В настоящее время первичная диагностика хронического гепатита С (ХГС) нередко основывается исключительно на выявлении маркеров HCV, так как клинические и биохимические признаки гепатита отсутствуют или выражены минимально. Известно, что «латентная» фаза ХГС может сопровождаться значительным разнообразием патоморфологических вариантов поражения печеночной ткани. В этой ситуации единственная возможность объективной оценки активности и стадии заболевания связана с морфологическим исследованием гепатобиоптата (по наличию и выраженности некровоспалительных процессов и фиброза).

Оценка активности воспалительного процесса и динамики фиброгенеза в ткани печени при ХГС является ключевым вопросом в определении характера, направленности развития и темпов прогрессирования патологического процесса, что побуждает к интенсивному поиску сывороточных маркеров воспаления и фиброгенеза [7, 9, 13]. Цитокины как регулирующие факторы межклеточного взаимодействия играют важную роль в патогенезе воспаления и фиброза, что объясняет повышенный интерес к их изучению при хронических гепатитах [1, 2, 4]. Многочисленные разрозненные данные касаются многофункционального провоспалительного цитокина TNF α , интерес к которому продиктован его закономерным участием в генезе воспалительного процесса. Степень выраженности воспалительных изменений в ткани печени тесно связана с формированием фиброза. Известно, что противовоспалительный цитокин TGF β является ключевым фактором регуляции фиброгенеза [6, 11]. Более того, выявлена прямая связь между повышением содержания TGF β в сыворотке крови и выраженностью фиброза различных органов [8, 14]. Это обстоятельство особенно существенно с точки

зрения клинической интерпретации данных о содержании этого цитокина в крови. Не случайно TGF β наряду с другими показателями обсуждается как сывороточный маркер коллагенообразования при гепатите [10, 12]. Таким образом, изучение динамики про- и противовоспалительных цитокинов при ХГС, особенно на субклинической стадии до развития тяжелого фиброза и цирроза печени, представляет, на наш взгляд, интерес с научной и клинической точки зрения.

Целью работы было определение уровня про- и противовоспалительных цитокинов (TNF α , TGF β) у больных ХГС в субклинической или малосимптомной стадии заболевания в сопоставлении с патоморфологической активностью процесса.

Материалы и методы

Обследовали 29 больных ХГС (17 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 18 до 50 лет (средний возраст 29,1 лет). Диагноз ХГС верифицирован выявлением в сыворотке крови антител к HCV (ИФА) и РНК HCV в ПЦР при отсутствии маркеров HBV и HAV. На основании анализа клинических проявлений заболевания, данных лабораторного и инструментального обследования (УЗИ органов брюшной полости) диагностирована субклиническая или малосимптомная стадия заболевания в случаях, когда имела место минимальная клинико-биохимическая активность гепатита. У всех больных диагноз ХГС подтвержден морфологически. По данным пункционной биопсии печени с помощью полуколичественного индекса оценивали гистологическую активность (ИГА) хронического гепатита (по R.J. Knodell): минимальная (1-3 балла) – 2 больных, слабая (ИГА 4-8 баллов) – 6, умеренная (9-12 баллов) – 18, выраженная (13 и более баллов) – 3 больных; наличие и выраженность фиброза печени: 0 – нет фиброза, 1 балл – слабо выраженный, 2 – умеренный, 3 – тяжелый фиброз, 4 – цирроз печени (по V.J. Desmet). В качестве группы сравнения обследовали 12 больных ХГС с манифестацией цирротической стадии заболевания в фазе декомпенсации печеночных функций (уровень билирубина $109,1 \pm 29,9$ мкмоль/л, активность АлАТ $56,8 \pm 8,1$ Е/л, тимоловая проба $9,1 \pm 0,9$ Ед, уровень γ -глобулинов $33,7 \pm 1,2\%$). HCV-цирроз печени (ЦП) сопровождался желтухой разной интенсивности и подтвержден наличи-

ем типичных осложнений (портальная гипертензия, отечно-асцитический синдром).

Уровень цитокинов определяли в сыворотке периферической крови с помощью «сэндвич» метода твердофазного иммуоферментного анализа. Для определения концентраций TNF α использовали коммерческие тест-системы ТОО «Протеиновый контур» (СПб), для TGF β – «DRG TGF β ELISA» (Германия). Показатели оптической плотности образцов измеряли на фотометре «ELM-3000» фирмы «DRG» (США) и выражали в пг/мл и нг/мл соответственно.

Полученные данные обработаны в статистической программе SPSS с использованием непараметрических критериев – однофакторный дисперсионный анализ, при сравнении групп применены критерий Манна-Уитни и корреляционный критерий Спирмана.

Результаты и обсуждение

На основании данных анамнеза продолжительность заболевания у обследованных больных в среднем составила $5,1 \pm 0,7$ лет, при этом у 13 пациентов инфекция имела продолжительность до 5,5 лет, у 8 – более 6 лет. У больных ЦП продолжительность заболевания была значительно больше (от 10 до 20 лет).

Эпидемиологические данные оказались типичными для гепатита С: у 21% больных были указания на предшествовавшее заболеванию внутривенное употребление психоактивных средств, у 65,5% – на оперативные и другие парентеральные вмешательства. Сопутствующая патология вне фазы обострения (в большинстве случаев гастроэнтерологическая) была выявлена у 18 (62,1%) обследованных.

Клинические проявления гепатита либо отсутствовали, либо были представлены скуд-

ными признаками нарушения самочувствия. Жалобы соответствовали астеновегетативному и диспепсическому синдромам и нередко выявлялись лишь при детальном опросе. Относительно часто можно было выявить общую слабость и повышенную утомляемость (20,7%), а также дискомфорт в правом подреберье (27,6%). При осмотре у 18 из 29 больных было обнаружено незначительное увеличение размеров печени. Патологических изменений со стороны других органов и систем не установлено.

Биохимическое исследование крови не выявило отличий от показателей нормы по основным диагностическим тестам (уровень билирубина $16,1 \pm 1,2$ мкмоль/л при норме до 20,5 мкмоль/л; тимоловая проба $3,7 \pm 0,7$ Ед при норме до 5 Ед; уровень общего белка $74,5 \pm 1,4$ г/л при норме 65-85 г/л; γ -глобулинов $17,7 \pm 0,9\%$ при норме 19-21%). Исключение составила активность АлАТ, которая имела тенденцию к повышению и составила в среднем $68,1 \pm 6,6$ Ед/л при норме до 40 Ед/л ($p > 0,05$). При этом активность АлАТ у 10 больных оставалась в пределах нормы и у 19 была повышена, но не превышала норму более чем в 3 раза. По данным УЗИ, признаки диффузных изменений ткани печени обнаружены у 48,3% больных.

Уровень TNF α (табл. 1) у больных ХГС имел тенденцию к повышению при сравнении среднего показателя с контрольными значениями (соответственно, 25,6 пг/мл и $12,5 \pm 6,1$ пг/мл, $p > 0,05$). При этом у каждого 5-го пациента уровень TNF α был повышенным. Средние показатели TGF β в сыворотке крови больных достоверно превышали уровень цитокина в контрольной группе ($36,5 \pm 5,8$ нг/мл и $1,9 \pm 1,1$ нг/мл, $p < 0,01$). Следует отметить, что повышенный показатель

ТАБЛИЦА 1. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У БОЛЬНЫХ ХГС С СУБКЛИНИЧЕСКИМ/МАЛОСИМПТОМНЫМ И МАНИФЕСТНЫМ (ЦИРРОТИЧЕСКАЯ СТАДИЯ) ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Показатель	Контрольная группа	ХГС	
		Субклиническая/ малосимптомная фаза (n = 29)	Стадия цирроза (n = 12)
TNF α (пг/мл)	$12,5 \pm 6,1$	$25,6 \pm 11,9$	$276,1 \pm 115,8^*$
TGF β (нг/мл)	$1,9 \pm 1,1$	$36,5 \pm 5,8^{**}$	$49,6 \pm 6,8^{**}$

Примечания: * – $p_1 < 0,05$ относительно контроля; ** – $p_2 < 0,01$ относительно контроля.

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ TNF α И TGF β У БОЛЬНЫХ ХГС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (ИГА) И СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ ФИБРОЗА ПО ДАННЫМ ПУНКЦИОННОЙ БИОПСИИ ПЕЧЕНИ

Показатель (контрольная группа)	ХГС субклиническая/малосимптомная фаза				Цирроз (клиническая манифестация) n = 12
	Гистологическая активность (по ИГА)		Выраженность фиброза печени по оценке гепатобиоптата		
	ИГА 1-8 баллов n = 8	ИГА более 9 баллов n = 21	Отсутствует/ минимально выражен n = 25	Умеренный/ выраженный фиброз n = 4	
	(1)	(2)	(3)	(4)	
TNF α (12,5 \pm 6,1 пг/мл)	5,1 \pm 2,0	33,4 \pm 16,2 $p_{1-2} > 0,05$	17,9 \pm 8,9	73,3 \pm 69,5	276,1 \pm 115,1* $P_{3-5} < 0,01$
TGF β (1,9 \pm 1,1 нг/мл)	33,6 \pm 10,8	37,6 \pm 7,1* $p_{1-2} > 0,05$	39,1 \pm 6,6**	20,6 \pm 6,7	49,6 \pm 6,8**

Примечания: * – $p < 0,05$ относительно контроля; ** – $p < 0,01$ относительно контроля.

был выявлен у 28 из 29 обследованных больных ХГС. Как видно из данных таблицы 1, в случаях клинической манифестации ХГС (цирротическая стадия) средние показатели TNF α и TGF β имели тенденцию к более высоким значениям, чем в случаях субклинического и малосимптомного течения ХГС.

Для сопоставления результатов обследования больных с данными морфологического исследования биоптата печени мы разделили их на две группы. В 1-ю вошли 8 пациентов, у которых ХГС имел гистологические признаки минимального и слабовыраженного воспаления (ИГА от 1 до 8 баллов), во 2-ю – 21 больной с умеренной и выраженной активностью воспаления (ИГА от 9 до 13 баллов).

При оценке уровня цитолиза у пациентов с разной гистологической активностью гепатита обнаружены более высокие показатели АлАТ в случаях с большей активностью воспаления в печени (42,0 \pm 7,0 Ед/л в 1-й группе и 78,0 \pm 7,7 Ед/л во 2-й группе, $p < 0,05$).

Исследование уровней про- и противовоспалительных цитокинов в зависимости от гистологической активности воспаления (табл. 2), выявило отчетливую тенденцию к более высокому уровню TNF α у больных с более выраженным воспалением печеночной ткани (по показателю ИГА). Вместе с тем уровень противовоспалительного цитокина TGF β имел стабильно высокие показатели в выделенных нами группах больных.

При оценке морфологических признаков фиброза использовали шкалу от 0 баллов (отсутствие фиброза) до 4 баллов (цирроз), причем в большинстве случаев больные ХГС имели признаки слабовыраженного фиброза (в среднем 1,25 \pm 0,2 баллов). По степени выраженности фиброза печени больных также разделили на две группы – больные с отсутствием фиброза (2 больных) или слабовыраженным фиброзом (23 человека) и пациенты, имевшие гистологические признаки умеренно выраженного фиброза. По средним показателям обнаружена тенденция к более высокому содержанию в крови TNF α в случаях с выраженным фиброзом (табл. 2). Это наблюдение подтвердили и более высокие показатели этого цитокина у больных с ЦП. Интересно, что у 2-х больных ХГС при отсутствии морфологических признаков фиброза печени в биоптате уровень TNF α был минимальным – 0,8 \pm 0,3 пг/мл. Что касается TGF β , то показатель был существенно повышен у больных с разной степенью выраженности фиброза, причем в цирротической стадии выявлена тенденция к более высокому уровню этого цитокина в крови (49,6 \pm 6,8 нг/мл).

Анализ уровней исследуемых цитокинов у больных ХГС с разной продолжительностью заболевания не выявил существенных различий. Так, при продолжительности ХГС до 5,5 лет и более 6 лет средние показатели цитокинов состав-

вили, соответственно, TNF α – 34,2 \pm 21,6 пг/мл и 31,7 \pm 26,2 пг/мл; TGF β – 33,9 \pm 8,1 нг/мл и 43,6 \pm 14,7 нг/мл ($p > 0,05$).

Сопоставление уровней цитокинов и биохимических характеристик гепатита (цитоллиза по уровню АлАТ и мезенхимального воспаления по уровню γ -глобулинов, тимоловой пробы) не выявило связи между большинством показателей. Исключение составила тесная корреляционная связь между уровнями TNF α и γ -глобулинов ($r = 0,8$; $p < 0,01$).

Таким образом, обнаружение у всех больных ХГС вне зависимости от выраженности воспаления и фиброза печени повышенного уровня противовоспалительного цитокина TGF β подтверждает его закономерное участие в текущем патологическом процессе, в частности в развитии фиброза. Неоднозначные изменения уровня TNF α в крови у больных ХГС с тенденцией к более высокому уровню этого цитокина в случаях с выраженной гистологической активностью позволяют высказать предположение о возможной связи с разной степенью включения компенсаторно-приспособительных реакций на фоне текущего хронического гепатита. Исключительная важность объективной оценки при ХГС выраженности и темпов развития фиброза печени, тесно связанного с воспалительными процессами в паренхиме органа, побуждает к дальнейшему изучению патогенетического значения цитокинового спектра при этой патологии, что может стать основой не только разработки прогноза, но и новых возможностей терапии.

Список литературы

1. Алленов М.Н., Волчкова Е.В., Умбетова К.Т., Иванова И.В., Сундукова А.Н., Зуевская С.Н., Свиридова М.Б., Пак С.Г. Уровень цитокинов воспаления и характер аутоиммунных нарушений у больных гепатитом С // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2006. – № 5. – С. 45-49.

2. Астахин А.В., Афанасьев С.С., Воробьев А.А., Левитан Б.Н., Алешкин В.А. Роль цитокинов и интерферона- α в патогенезе храни-

ческих диффузных заболеваний печени // Вест. РАМН. – 2004. – № 4. – С. 19-23.

3. Корочкина О.В., Собчак Д.М., Михайлова Е.А., Монакова Э.А. Показатели цитокиновой регуляции иммунного ответа у больных хроническим гепатитом С // Клинич. медицина. – 2003. – № 9. – С. 49-53

4. Скляр Л.Ф., Никифоров Н.Д., Маркелова Е.В., Попов А.Ф., Иванис В.А. Цитокиновый профиль при хроническом гепатите С // Клинич. медицина. – 2005. – № 10. – С. 40-44.

5. Черных Е.Р., Старостина Н.М., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Агапитова С.В., Шипунов М.В., Останин А.А., Козлов В.А. Цитокиновый профиль у больных хроническими вирусными гепатитами с фиброзом и циррозом // Мед. иммунология. – 2006. – Т. 8, № 4. – С. 539-546.

6. Butt R.P., Laurent G.J., Bishop J.E. Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factor // Eur. J. Cell Biol. – 1995. – Vol. 68. – P. 330-335.

7. Castera L., Vergniol J., Foucher J. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C // Gastroenterology. – 2005. – Vol. 128, N 2. – P. 343-350.

8. Fielitz J., Hein S., Mitrovic V., Pregla R., Zurbrugg H.R., Warnecke C., Schaper J., Fleck E., Regitz-Zagrosek V. Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease // J. Am. Coll. Cardiol. – 2001. – Vol. 37. – P. 1443-1449.

9. Friderich-Rust M., Ong M.N., Herrman E. Real-time elastography for non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis // J. Hepatol. – 2006. – Vol. 44. – P. 197.

10. Friedman S.L., Jacquelyn J. Mechanisms and therapy of hepatic fibrosis // J. Hepatol. – 2000. – Vol. 32, N 6. – P. 1403-1408.

11. Petrov V.V., Fagard R., Lijnen P. Effect of angiotensin II and transforming growth factor- β on collagen secretion in cardiac fibroblasts // Am. J. Hypertens. – 1998. – Vol. 11. – P. 146A.

12. Poynard T., Munteanu M., Imbert-Bismut F. Prospective analysis of discordant result between

biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C // Clin. Chem. – 2004. – Vol. 50, N 6. – P. 1344-1355.

13. Sebastiani G., Vario A., Guido M. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C // J. Hepatol. – 2006. – Vol. 44, N 4. – P. 686-693.

14. Sun Y., Zhang J.Q., Zhang J., Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrosis tissue after infarction in rats // J. Lab. Clin. Med. – 2000. – Vol. 135. – P. 316-323.

поступила в редакцию 15.02.2007

принята к печати 22.03.2007