

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616.36-004-092:612.017.1]-078.33

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА И ПОЛИМОРФИЗМА ЕГО ГЕНА (G4682A) В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

И.А. Булатова^{1}, А.П. Щекотова¹, О.В. Долгих², С.В. Падучева¹, А.В. Кривцов²*

¹Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера,

²Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, г. Пермь, Россия

DIAGNOSTIC VALUE OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA AND POLYMORPHYSM OF ITS GENE (G4682A) IN HEPATIC CIRRHOSIS PROGRESSION

I.A. Bulatova^{1}, A.P. Schekotova¹, O.V. Dolgikh², S.V. Paducheva¹, A.V. Krivtsov²*

¹Perm State Medical University named after E.A. Wagner,

²Federal Scientific Center of Medical-Preventive Techniques for Population Health Risk Management, Perm, Russian Federation

Цель. Определить диагностическое значение фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) и полиморфизма гена *TNF-A* (G4682A) в прогрессировании цирроза печени (ЦП).

Материалы и методы. Обследован 81 больной ЦП и 81 здоровый донор. В крови оценивали концентрацию ФНО- α и полиморфизм гена *TNF-A* (G4682A).

Результаты. Сывороточный уровень ФНО- α был повышен у 99 % больных ЦП по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$), прямо коррелировал со степенью тяжести по шкале Чайльда–Пью ($r = 0,31$; $p = 0,004$) и обратно с уровнем альбумина ($r = -0,24$; $p = 0,03$). При компенсированной стадии ЦП ($n = 23$) ФНО- α составил 2,7 (2,5–3,3) пг/мл, при субкомпенсированной ($n = 26$) – 3,6 (3,0–4,9) ($p = 0,01$), при декомпенсированной ($n = 32$) – 3,9 (2,9–9,8) пг/мл ($p = 0,34$). Пороговое значение ФНО- α для дифференциации компенсированной от субкомпенсированной и декомпенсированных степеней ЦП равнялось 3 пг/мл при чувствительности – 65,0 % и специфичности – 76,9 %. Встречаемости аллельных вариаций гена *TNF-A* (G4682A) у доноров и больных ЦП, а также и ассоциации изучаемого гена с темпами прогрессирования заболевания не было выявлено.

© Булатова И.А., Щекотова А.П., Долгих О.В., Падучева С.В., Кривцов А.В., 2016

тел. 8 902 839-17-80

e-mail: bula.1977@mail.ru

[Булатова И.А. (*контактное лицо) – кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО; Щекотова А.П. – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики ФДПО; Долгих О.В. – доктор медицинских наук, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики; Падучева С.В. – ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО; Кривцов А.В. – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммуногенетики].

Выводы. Определение уровня ФНО- α позволяет оценить степень тяжести ЦП. При сывороточной концентрации ФНО- α менее или равной 3 пг/мл диагностируют компенсированную форму ЦП, при уровне ФНО- α более 3 пг/мл устанавливают субкомпенсированный ЦП.

Ключевые слова. Цирроз печени, цитокины, фактор некроза опухоли-альфа, ген *TNF-A*.

Aim. The aim of the study was to assess the diagnostic value of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and polymorphism of its gene *TNF-A* (G4682A) in hepatic cirrhosis (HC) progression.

Materials and methods. Eighty one persons with HC and 81 healthy donors were examined. Blood TNF- α concentration and polymorphism of gene *TNF-A* (G4682A) were estimated.

Results. Serum TNF- α level was increased in 99 % of HC patients as compared with the control group ($p < 0,001$), it directly correlated with the degree of severity gj by Child-Pugh grading scale ($r = 0,31$; $p = 0,004$) and inversely – with albumin level ($r = -0,24$; $p = 0,03$). In case of compensated stage of HC ($n = 23$), TNF- α was 2,7 (2,5–3,3) pg/ml, in subcompensated ($n = 26$) – 3,6 (3,0–4,9) ($p = 0,01$), in decompensated ($n = 32$) – 3,9 (2,9–9,8) pg/ml ($p = 0,34$). The threshold value of TNF- α for differentiation of compensated stage from subcompensated and decompensated HC stages was 3 pg/ml with sensibility 65,0 % and specificity 76,9 %. Occurrence of allele variations of gene *TNF-A* (G4682A) as well as association of the studied gene with the tempos of disease progression were compared in donors and HC patients.

Conclusions. Determination of TNF- α level permits to assess the degree of HC severity. When serum concentration of TNF- α is lower or equal to 3 pg/ml, the compensated HC form is diagnosed, with TNF- α level higher than 3 pg/ml – the subcompensated HC is diagnosed.

Key words. Hepatic cirrhosis, tumor necrosis factor alpha, *TNF-A* gene.

ВВЕДЕНИЕ

Изучению цирроза печени (ЦП) и его осложнений посвящено много клинических и экспериментальных исследований. Особое внимание уделяется изучению роли цитокинов в механизмах развития иммунно-воспалительных процессов, приводящих к прогрессированию повреждения печени. Так, например, заболевания печени вирусного генеза сопровождаются активацией выработки провоспалительных цитокинов, а повышение продукции фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) ассоциировано с процессами цитолиза, холестаза и прогрессирования фиброза [1, 2, 9, 10]. По данным Е.Р. Черных и соавт. [8], трансформация фиброза в цирроз вирусной этиологии связана с усилением спонтанной продукции цитокинов, отражающих характер клинического течения заболевания. В литературе есть данные об активации цитокинового каскада при ЦП алкогольной этиологии [6]. При этом одни авторы на фоне снижения компенсации ЦП отмечают незначительное

повышение сывороточных уровней цитокинов в основном в пределах референсных значений, за исключением интерлейкина-6 [5]. В других исследованиях приводятся данные об истощении иммунных механизмов при вирусных ЦП [7].

В последние годы большое число исследований посвящено выявлению мутаций генов и использованию их в клинической практике в качестве генетических маркеров развития и прогрессирования различных патологий человека, что позволяет прогнозировать риск развития заболевания, тяжесть его течения, а также подобрать для пациента адекватную специфическую терапию [11]. Например, разработана генетическая панель предикторов риска развития ЦП на основе анализа 7 полиморфизмов кандидатных генов [13]. К настоящему времени опубликованы данные о влиянии некоторых аллельных вариантов гена *TNF-A* на развитие и прогрессирование вирусных заболеваний печени. Однонуклеотидный полиморфизм гена *TNF-A* в промоторной части в положении –238 влияет на экспрессию и содержание этого

цитокина в крови, а генотипы GA и AA достоверно чаще обнаруживаются у пациентов с быстрым развитием фиброза [4]. Наличие в геноме пациента с гепатитом С аллеля A в виде носительства гетерозиготы GA гена *TNF-A* в локусе (G4682A) ассоциировано с высокими концентрациями трансаминаз [2].

Цель исследования – определить диагностическое значение фактора некроза опухоли-альфа и полиморфизма гена *TNF-A* (G4682A) в прогрессировании цирроза печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследован 81 пациент (41 мужчина и 40 женщин) с ЦП разной этиологии, средний возраст больных $52,7 \pm 13,6$ г. По этиологическому фактору больные ЦП были распределены следующим образом: ЦП вирусного генеза – у 50 (62 %) человек, невирусной этиологии – у 21 (26 %) и 10 (12 %) больных со смешанным ЦП (алкоголь+вирус). Сопоставимая группа контроля включала 80 здоровых доноров. Диагноз ЦП пациентам исследуемой группы был поставлен на основании анамнестических данных и результатов физикального, инструментального, а также лабораторного обследования. Исследуемые больные были разделены на 3 степени тяжести заболевания по шкале Чайльда–Пью [12, 14]: класс А – компенсированный ЦП ($n = 23$), класс В – субкомпенсированный ($n = 26$) и класс С – декомпенсированный ЦП ($n = 32$).

Для исследования биохимических показателей аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), альбумина, общего и прямого билирубина использовали автоматический анализатор Architect-4000 (Abbott, США). Концентрацию ФНО- α определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «альфа-ФНО – ИФА – БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Исследование однонуклеотидного полиморфизма гена *TNF-A*

(G4682A) у 46 пациентов с ЦП и 80 здоровых доноров проводили на амплификаторе Real-time «CFX-96» Bio-Rad Laboratories, Inc. (США) соответствующим набором реагентов «SNP-скрин» (ЗАО «Синтол», г. Москва).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft). Данные описывались с помощью среднего и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) и в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля). Для оценки значимости различий независимых групп применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводился с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Для расчета пороговых значений и диагностической эффективности показателя, имеющего диагностическую значимость, проводился ROC-анализ и расчет отношения шансов (OR). Диагностическую ценность параметра оценивали по шкале значений площади под ROC-кривой (AUC). Оценка адекватности прогноза проводилась по четырехпольной таблице с расчетом показателей чувствительности и специфичности, воспроизводимости и соответствия [3]. Для описания соотношения частот генотипов и аллелей изучаемого гена использовался метод χ^2 . Различия в двух популяциях рассчитывались по отношению шансов (OR) с использованием подхода «случай–контроль» для различных моделей наследования: аддитивной, общей, мультипликативной, доминантной и рецессивной и считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сывороточная концентрация провоспалительного цитокина ФНО- α у 99 % больных ЦП была выше, чем данный показатель в группе контроля, и составила 3,5 (2,6–4,9)

пг/мл ($p < 0,001$), что свидетельствовало об активации воспалительного процесса.

Цитолиз по уровню АСТ, холестаза и нарушение синтетической функции по данным альбумина достоверно нарастали по мере прогрессирования ЦП. Концентрация ФНО- α в сыворотке крови у больных с субкомпенси-

рованным ЦП (класс В) была достоверно выше, чем при компенсированной форме класса А ($p = 0,01$). При этом сывороточный уровень данного цитокина у пациентов с декомпенсированным ЦП (класс С) хотя и имел тенденцию к повышению, но без значимых отличий от класса В ($p = 0,34$) (таблица).

Биохимические показатели и концентрация ФНО- α в сыворотке крови больных ЦП в зависимости от степени тяжести, Me (25–75 процентиль)

Показатель	Класс А ($n = 23$), компенсированный	Класс В ($n = 26$), субкомпенсированный	Класс С ($n = 32$), декомпенсированный
АЛТ, Е/л	44,0 (25–100)	43,5 (27–66,7)	45,0 (29,0–60,7)
АСТ, Е/л	42,0 (30–74)	55,5 (49–95) ¹	79,5 (65,1–132,5) ²
Альбумин, г/л	42,0 (39–46,3)	34,5 (29,7–37,7) ¹	28,9 (25,3–32,3) ²
Билирубин общий, мкмоль/л	27,0 (12,9–39,0)	46,3 (21–140) ¹	99,5 (31,3–192,0) ²
Билирубин прямой, мкмоль/л	11,9 (6–14,8)	21,6 (14,5–37,9) ¹	49,2 (26,2–109,7) ²
ФНО- α , пг/мл	2,7 (2,5–3,3)	3,6 (3,0–4,9) ¹	3,9 (2,9–9,8)

Примечание: ¹ – достоверность различий в классах А и В; ² – достоверность различий в классах В и С.

В рамках исследования была установлена прямая корреляционная связь концентрации ФНО- α со степенью тяжести ЦП по шкале Чайлда–Пью ($r = 0,31$; $p = 0,004$) и обратная взаимосвязь с уровнем альбумина ($r = -0,24$; $p = 0,03$).

Оценку диагностической значимости провоспалительного цитокина ФНО- α для

дифференциации компенсированной и субкомпенсированной степени ЦП и выбор его порогового значения проводили с помощью ROC-кривых. Площадь ROC-кривой ФНО- α для дифференциации данных степеней ЦП составила $AUC\ 0,72 \pm 0,07$ (доверительный интервал 0,6–0,84), $p = 0,003$ (рис. 1).

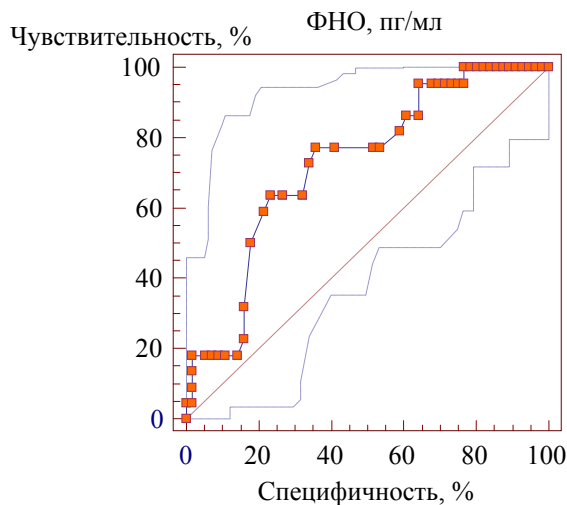


Рис. 1. ROC-кривая ФНО- α для дифференциации компенсированной и субкомпенсированной степени ЦП

Индекс Юдена для данного показателя составил 0,41. Оптимальное пороговое значение ФНО- α для дифференциации компенсированной от субкомпенсированной и декомпенсированных степеней ЦП равнялось 3 пг/мл при чувствительности 65,0 % и специфичности 76,9 %. Таким образом, при сывороточной концентрации ФНО- α менее или равной 3 пг/мл диагностируют компенсированную форму ЦП, при уровне ФНО- α более 3 пг/мл устанавливают субкомпенсированный ЦП.

При изучении распространенности генотипов и аллелей полиморфизма гена

TNF-A (G4682A) в группах доноров и больных ЦП статистически значимые различия были получены только для доминантного генотипа GG, который в группе больных ЦП встречался значимо реже – в 34,78 % случаев ($\chi^2 = 4,22$; $p = 0,04$), чем в когорте доноров (в 53,75 %). При этом гетерозигота GA и минорный аллель A исследуемого гена у пациентов с ЦП регистрировались несколько чаще в 58,7 и 6,52 %, хотя и недостоверно, чем у доноров – в 43,75 ($\chi^2 = 4,76,37$; $p = 0,09$; $OR = 1,83$) и 2,5 % ($\chi^2 = 3,78$; $p = 0,06$; $OR = 1,74$) случаев соответственно (рис. 2).

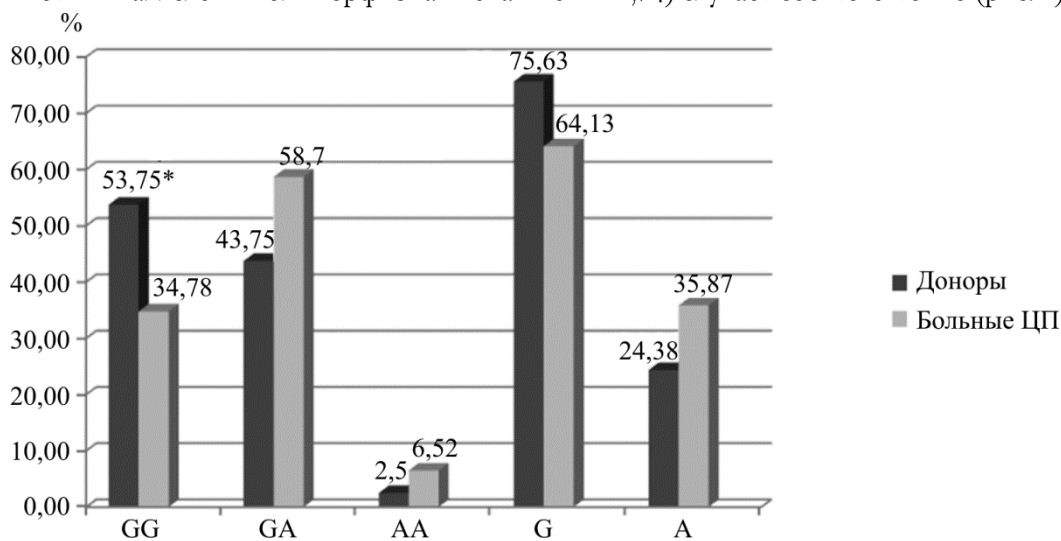


Рис. 2. Частота обнаружения аллельных пар в полиморфных локусах гена *TNF-A* (G4682A) в группах доноров и пациентов с ЦП (* различия достоверны)

Для сравнительного анализа влияния полиморфизма изучаемого гена на тяжесть ЦП больные были разделены на две группы. В I группу вошли 28 (61 %) пациентов с компенсированной (класс А) и субкомпенсированной (класс В) формой ЦП по шкале Чайльда–Пью. Во II группу были включены 18 (39 %) человек с декомпенсированной (класс С) формой ЦП. В обеих группах генотипы GG и GA и AA встречались с одинаковой частотой ($p = 0,42$, $p = 0,38$ и $p = 0,83$ соответственно). Достоверных различий частоты встречаемости минорного аллеля A также не было найдено ($p = 0,59$).

То есть ассоциации между аллельными вариациями полиморфных локусов гена *TNF-A* (G4682A) с темпами прогрессирования ЦП нами не выявлено.

Выводы

1. В ходе исследования обнаружено повышение продукции ФНО- α у 99 % больных ЦП вирусной, невирусной и смешанной этиологии.

2. Сывороточная концентрация ФНО- α повышалась по мере прогрессирования ЦП, что позволяет использовать данный тест

в качестве дополнительного лабораторного маркера для дифференциации компенсированной стадии от субкомпенсированной и декомпенсированной.

3. При сывороточной концентрации ФНО- α менее или равной 3 пг/мл диагностируют компенсированную форму ЦП, при уровне ФНО- α более 3 пг/мл устанавливают субкомпенсированный ЦП.

4. Статистически значимых различий частоты встречаемости генотипов и аллелей гена *TNF-A* (G4682A) в группах доноров и больных ЦП, а также ассоциации между аллельными вариациями полиморфных локусов изучаемого гена с темпами прогрессирования заболевания не было выявлено.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Антонова Т.В., Широнина Н.А., Гавришьева Н.А. Концентрация провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- α при хроническом вирусном гепатите. Тезисы доклада VII Российского съезда инфекционистов. Н. Новгород 2006; 138.
2. Булатова И.А., Щёктова А.П., Щекотов В.В., Кривцов А.В., Насибуллина Н.И. Роль фактора некроза опухоли-альфа и полиморфизма гена TNF в локусе G4682A в прогрессировании хронического гепатита С. Новости «Вектор-Бест» 2015; 3 (77); 5–10.
3. Власов В.В. Эффективность диагностических исследований. М.: Медицина 1988; 256.
4. Колотвин А.В. Прогностическая значимость генетического полиморфизма патогена и хозяина для оценки эффективности терапии и развития фиброза печени при хроническом гепатите С: автореф. дис. ... канд. биол. наук М. 2014; 24.
5. Куликов В.Е., Тонеева М.А., Емелина Т.А., Антонова Э.Р., Корнилова В.А. Цитокиновый статус у больных циррозами печени вирусной этиологии. Международный научно-исследовательский журнал 2015; 4; available at: <http://research-journal.org/medical/citokinovyj-status-ubolnyx-cirroزامi-pecheni-virusnoj-etologii>.
6. Маевская М.В., Буеверов А.О. Цитокины в патогенезе алкогольного гепатита и возможности терапии. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии 2009; 2 (19); 14–19.
7. Сапронова Н.Г., Лукьянов С.В., Чигаева Е.В. Особенности лечения пациентов с вирус-ассоциированным циррозом печени. Современные проблемы науки и образования 2013; 6; available at: www.science-education.ru/113-10856.
8. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Шевела Е.Я., Агаитова С.В., Шитинов М.В., Останин А.А., Козлов В.А. Цитокиновый профиль у больных хроническими вирусными гепатитами с фиброзом и циррозом печени. Медицинская иммунология 2006; 4 (8); 539–546.
9. Abayli B., Canataroglu A., Akkiz H. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection. Turk. J. Gastroenterol. 2003; 1; 7–11.
10. Abmad A., Abmad R. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic approaches. Saudi. J. Gastroenterol. 2012; 18; 155–167.
11. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. Nat. Rev. Microbiol. 2013; 11; 482–496.
12. Child C.G., Turcotte J.G. Surgery and portal hypertension. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1964; 50.
13. Hongjin H., Shiffman M. L., Cheung R.C., Layden T.J., Friedman S., Abar O.T., Yee L., Chokkalingam A.P., Schrodi S.J., Chan J. Identification of two gene variants associated with risk of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Gastroenterol. 2006; 130; 1679–1687.
14. Pugh R.N.H., Murray-Lyon I.M., Danson J.L. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Brit. J. Surg. 1973; 8 (60); 646–648.

Материал поступил в редакцию 27.05.2016