

УДК 616.36.002.036.2.571.53

Л. Р. ТАЛЫШИНСКАЯ

/Азербайджанский медицинский университет/

Сравнительное изучение некоторых биохимических показателей и цитокинов при вирусном гепатите С

Резюме

Целью данной работы было исследование диагностического и прогностического значений биохимических показателей крови и уровня некоторых цитокинов при вирусном гепатите С. Проведено исследование сыворотки крови группы пациентов: 33 носителя ВГС и 44 больных ВГС. С диагностической целью проводили коллоидные пробы, определяли активность печеночных ферментов и концентрацию билирубина, которые характеризуют функциональное состояние печени, а также концентрацию цитокинов. Было выявлено, что у больных ВГС, по сравнению с носителями ВГС, концентрация билирубина и активность печеночных ферментов были более высокими. Изменение коллоидных проб указывает на снижение синтетической функции печени. Повышение уровня фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α), характеризующего воспалительный процесс, указывает на элиминацию поврежденных в результате некроза и апоптоза клеток; повышение концентрации трансформирующего фактора роста (TGF- β_1), который считается основным медиатором фиброгенеза, доказывает начало фибротических процессов в печени.

Ключевые слова: носители вируса гепатита С, больные вирусным гепатитом С, определение биохимических показателей, функциональное состояние печени.

По данным ВОЗ, во всем мире вирусным гепатитом С (ВГС) поражено более 150 млн человек. ВГС является серьезной проблемой здравоохранения и скрытой угрозой здоровью мирового общества из-за своего субклинического бессимптомного течения. В большинстве случаев острый гепатит С остается незамеченным и нелеченым, что обуславливает в большинстве случаев (55–85 %) переход инфекции в хроническую форму. Постоянная персистенция вируса в печени и других органах и тканях организма при неблагоприятных условиях приводит к циррозу печени, печеночной недостаточности и даже гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК). Это, в свою очередь, заканчивается смертью сотен тысяч людей ежегодно [3, 4].

С тех пор как в 1989 г. М. Houghton и соавт. сообщили об идентификации вируса гепатита С, являющегося этиологическим фактором в подавляющем большинстве (90 %) случаев хронических гепатитов, ранее обозначаемых как «ни А, ни В», были достигнуты значительные успехи в изучении и лечении данного заболевания. Вирус гепатита С относят к семейству *Flaviviridae* к роду *Hepacivirus* [1].

ВГС характеризуется общими симптомами поражения печени и внепеченочными проявлениями, что, в свою очередь, обуславливает осложнения заболевания при длительном течении [2, 7].

Возбудитель гепатита С – парентеральный вирус, наиболее распространенным путем инфицирования является использование небезопасных инъекций, недостаточно стерилизованного медицинского оборудования, а также переливание непроверенной крови и ее продуктов [3].

В настоящее время основными методами лечения ВГС является комплексное применение противовирусных препаратов (пегинтерфероны, рибавирин, теллапревир, боцепревир).

Применение различных вариантов комплексной противовирусной терапии дает положительный эффект, но, безусловно, необходимо учитывать индивидуальные особенности каждого пациента. Также невозможно рекомендовать противовирусную терапию во всех случаях заболевания. Следует отметить также, что эффективной вакцины против ВГС пока не существует [5, 6].

Ввиду вышесказанного возрастает значимость постоянного мониторинга функционального состояния печени у инфицированных ВГС пациентов. Следует отметить незаменимость лабораторно-инструментальных методов для диагностики тяжести течения заболевания, а также для оценки эффективности противовирусной терапии.

Материалы и методы исследования

Для исследования были взяты образцы крови у пациентов с подтвержденным диагнозом инфицирования ВГС. Контрольную группу составили 16 здоровых человек: 6 женщин и 10 мужчин в возрасте 25–55 лет. Группу носителей ВГС составили 35 пациентов с нормальным уровнем трансаминаз – 14 мужчин и 21 женщина в возрасте 28–45 лет. Группу больных ВГС составили 44 пациента с повышенными показателями активности АЛАТ, АсАТ и выраженной клинической симптоматикой – 16 женщин и 28 мужчин в возрасте 35–55 лет.

Биохимические методы исследования проводили с помощью реактивов Human, Германия. Активность печеночных ферментов определяли спектрофотометрическим методом, также проводили осадочно-коллоидные пробы – пробу Вельмана, сулемовую и тимоловую пробы. Их принцип основан на осаждении белков сыворотки крови под воздействием различных реагентов, что вызывает нарушение дисперсности и помутнение раствора. Осадочные пробы применяют с диагностической целью для оценки изменения соотношения альбумины/глобулины, зачастую наблюдается сдвиг уровня гамма-глобулинов крови. Тимоловая проба является более специфичной для функционального исследования печени, чем другие коллоидные пробы, и применяется для дифференциальной диагностики заболеваний печени [9].

Билирубин определяют с помощью колориметрического диасометода, который базируется на взаимодействии билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой с образованием азопигментов.

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) (ELISA) определяли концентрации цитокинов (ИЛ-8, ФНО, ТФР- β), используя наборы реактивов фирмы «BenderMedSystems» (Австрия).

Принцип иммуноферментного анализа заключается в том, что фермент-меченные комплексы антиген-антитело вступают в реакцию с субстратом, в результате происходит изменение окраски пробы, при этом интенсивность окраски пропорциональна концентрации искомого вещества. Оптическую плотность пробы измеряют с помощью ИФА анализатора, расчет делают с помощью калибровочного графика.

Результаты и их обсуждение

Большое клинико-диагностическое значение имеет определение биохимических показателей, характеризующих функциональное состояние печени. В ходе наших исследований выяснилось, что в группе носителей ВГС показатели сулемовой пробы снизились на 18,7 %, а в группе больных ВГС – на 38,8 %. Результаты пробы Вельмана снизились на 25 % в группе носителей ВГС, в группе больных ВГС – на 49,8 % соответственно. Показатели тимоловой пробы в группе носителей ВГС увеличились на 81,7 % по сравнению с контролем. В то же время в группе больных ВГС этот

Таблица 1. Биохимические показатели сыворотки крови пациентов, инфицированных вирусом гепатита С

Показатели	Группы		
	Контроль (n=16)	ВГС-носители (n=35)	ВГС-больные (n=44)
Сулемовая проба, мл	1,90±0,05 (1,62–2,18)	1,55±0,02 (1,37–1,72) ***	1,16±0,04 (0,64–1,77) ***
Проба Вельмана, мл	0,401±0,019 (0,25–0,48)	0,301±0,013 (0,15–0,4) ***	0,201±0,010 (0,1–0,33) ***
Тимоловая проба, Ед	3,12±0,15 (1,9–3,8)	5,67±0,28 (2,8–7,8) ***	9,35±0,46 (4,5–14,2) ***
Общий билирубин, мкмоль/л	12,6±0,3 (11,1–14,4)	27,1±1,4 (12,8–43) ***	53,0±2,0 (29,2–76,4) ***
Связанный билирубин, мкмоль/л	3,2±0,1 (2,6–3,6)	15,2±1,3 (2,9–26,8) ***	29,6±1,8 (12,6–49,8) ***
Свободный билирубин, мкмоль/л	9,4±0,3 (8,2–11,1)	11,9±0,5 (8,6–18,9) **	23,4±1,0 (12,3–35,7) ***

Примечание. Статистически значимая разница со средними показателями группы по сравнению с контролем: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

показатель был повышен в 3 раза. В группе носителей ВГС уровень общего билирубина повысился в 2,2 раза, связанного билирубина – в 4,8 раза, свободного билирубина – на 26,7 %. Вместе с тем в группе больных ВГС показатели общего билирубина возросли в 4,2 раза, связанного билирубина – в 9,3 раза, свободного билирубина в 2,5 раза соответственно (табл. 1). Можно предположить, что повышение уровня глобулинов происходит, в основном, за счет иммуноглобулинов.

Показатели коллоидных проб, в частности тимоловой пробы, изменяются задолго до появления симптомов поражения печени [9]. Так как в печени происходит нарушение реакций превращения билирубина, гипербилирубинемия развивается за счет повышения обеих фракций, но все же преимущественно за счет фракции связанного билирубина. Количество свободного билирубина возрастает в связи с функциональной недостаточностью гепатоцитов и снижением их количества, а связанного – за счет увеличения проницаемости мембран клеточек печени, а также из-за нарушения секреции с желчью. Эти изменения указывают на прогрессирование заболевания и поражение паренхимы печени [9].

Согласно данным наших исследований, в группе ВГС-носителей активность печеночных ферментов была достоверно повышена (табл. 2). Так, активность АлАТ увеличилась на 74 %, а АсАТ на 43,9 %. В группе ВГС-больных повышение этих показателей было еще большим – АлАТ – в 4 раза, АсАТ – в 4,6 раза соответственно. Это можно объяснить активизацией патологического процесса в печени у ВГС-инфицированных. Повышение в группе носителей ВГС активности ЩФ на 54,1 % и ГГТ на 93 %, а в группе больных ВГС – ЩФ в 2,1 и ГГТ в 3,4 раза, по сравнению с контролем, указывает, что патологический процесс сопровождается холестазом.

Увеличение в группе ВГС-носителей активности α -амилазы на 62,8 %, а в группе ВГС-больных – в 2,1 раза, свидетельствует о вовлечении в патологический процесс и поджелудочной железы. Наряду с другими показателями, отмечено повышение активно-

Таблица 2. Активность ферментов печени в сыворотке крови пациентов, инфицированных вирусом гепатита С

Показатели	Группы		
	Контроль (n=16)	ВГС-носители (n=35)	ВГС-больные (n=44)
АлАТ, Ед/л	27,7±1,6 (19–37)	48,2±1,8 (31–69) ***	111,8±6,8 (52–199) ***
АсАТ, Ед/л	31,5±1,9 (23–45)	45,3±1,1 (32–59) ***	146,3±5,3 (49–197) ***
ГГТ, Ед/л	28,3±2,5 (15–46)	54,5±1,9 (35–70) ***	95,5±4,5 (48–152) ***
ЩФ, Ед/л	198,1±11,2 (82–241)	305,2±9,1 (214–395) ***	414,4±18,9 (217–621) ***
α -амилаза, Ед/л	64,7±5,7 (26–90)	105,3±3,4 (74–135) ***	133,8±3,9 (87–188) ***
ХЕ, Ед/л	7 326,9±806,8 (4650–14440)	12 375,7±643,6 (6200–19500) ***	3 320,2±144,2 (1600–5200) ***
ЛДГ, Ед/л	98,2±6,6 (62–154)	214,8±7,6 (149–292) ***	308,4±15,5 (159–526) ***

Примечания: 1. Статистически значимая разница со средними показателями группы по сравнению с контролем: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; 2. АлАТ – аланинаминотрансфераза, АсАТ – аспартатаминотрансфераза, ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза, ЩФ – щелочная фосфатаза, ХЭ – холинэстераза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

сти ЛДГ в группе носителей ВГС в 2,2 раза и показателя синтетической активности печени – холинэстеразы (ХЭ) – на 68,9 %. В то же время в группе больных ВГС показатель ЛДГ был повышен в 3,1 раза, а уровень ХЭ – снижен в 2,2 раза соответственно. Все эти изменения свидетельствуют о прогрессировании синдрома цитолиза. В оценке степени выраженности патологического процесса основное значение придается показателям активности АЛАТ и АсАТ.

Для оценки иммунного статуса ВГС-инфицированных пациентов большое диагностическое значение имеет изучение цитокинов. Известно, что цитокины – растворимые медиаторы межклеточных взаимодействий, которые являются своеобразным «языком общения» между клетками, тканями и системами организма. Биологически активные молекулы цитокинов в норме в первую очередь действуют локально и лишь некоторые из них обладают дистанционными эффектами. Функционально цитокины можно разделить на провоспалительные, воспалительные и противовоспалительные [12].

Исследуя цитокиновый профиль у ВГС-инфицированных пациентов мы старались охватить функционально различные цитокины. Выработка цитокинов происходит последовательно, что получило название «цитокиновый каскад». Интерлейкин-8 (ИЛ-8) не является основным провоспалительным цитокином, но, вместе с тем, характеризует начало воспалительного процесса. Он синтезируется тканевыми макрофагами в ответ на раздражение непосредственно самим инфекционным фактором. Исследования показали, что в группе носителей ВГС уровень ИЛ-8 повысился в 2,2 раза, а в группе больных ВГС – в 3,2 раза. В свою очередь провоспалительные цитокины, в том числе и ИЛ-8, активируют выработку медиаторов воспаления и пролиферации лимфоцитов [10–12].

Фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) активирует Т- и В-лимфоциты, естественные клетки-киллеры, опосредует гепатотоксический эффект, участвует в процессах апоптоза поврежденных клеток. Повышение уровня ФНО-α в сыворотке крови характеризует процессы воспаления и элиминации клеток путем прямой цитотоксичности или апоптоза. Показатель ФНО-α в группе ВГС-носителей увеличился в 4 раза, а в группе ВГС-больных – в 8,5 раза. У ВГС-инфицированных уровень ФНО-α характеризует воспалительный процесс, отражая тяжесть патологии.

Выраженный воспалительный процесс вызывает выработку факторов, ингибирующих пролиферацию лимфоцитов, что способствует выживанию клеток. Трансформирующий фактор роста (ТФРβ-1) индуцирует выработку белков межклеточного

матрикса – коллагенов, также ТФРβ-1 обладает иммуносупрессивными свойствами [11, 12] Уровень ТФРβ-1 в группе носителей ВГС повысился на 32,1 %, а в группе ВГС-больных – в 29,3 раза (табл. 3).

ТФРβ-1 является ключевым медиатором фиброгенеза человека. Он может выступать маркером начала фиброза печени в комплексной диагностике у ВГС-инфицированных только при отсутствии сопутствующих заболеваний.

Выводы

Данные проведенного исследования указывают на медленное прогрессирование и персистенцию вируса гепатита С, а также активизацию патологического процесса под влиянием различных факторов. Наблюдается относительная корреляция между функциональным состоянием печени, уровнем цитокинов и течением заболевания.

Периодическое определение биохимических показателей печени, характеризующих ее функциональное состояние у ВГС-инфицированных, имеет большое диагностическое значение в мониторинге заболевания.

Также важным показателем иммунного статуса является уровень цитокинов. Особенно необходимой является ранняя диагностика фиброза печени и своевременная коррекция тактики лечения пациентов.

Список использованной литературы

1. An open trial of interferon alfa recombinant for hepatitis C after liver transplantation: antiviral effects and risk of rejection / C. Feray, D. Samuel, M. Gigou [et al.] // *Hepatology*. – 1995 – № 22. – P. 1084–1089.
2. Радченко В. Г. Основы клинической гепатологии. Заболевания билиарной системы / В. Г. Радченко, А. В. Шабова, Е. Н. Зиновьева. – СПб.: Диалект-Бином, 2005. – 864 с.
3. World Health Organization, Hepatitis C, World Health Organization. – Geneva, Switzerland, 2003 – <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>.
4. Kanda T. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma / T. Kanda, O. Yokosuka, M. Omata // *Biology*. – 2013. – Vol. 2, № 1. – P. 304–316.
5. Mandal A. Combinations of siRNAs against La Autoantigen with NS5B or hVAP-A Have Additive Effect on Inhibition of HCV Replication / Anirban Mandal, Krishna Kumar Ganta, Binay Chaubey – Vol. 2016 (2016), Article ID 9671031, 11 p.
6. Fritz Klein, Ruth Neuhaus, Dennis Eurich, Jörg Hofmann, Sandra Bayraktar, Johann Pratschke, and Marcus Bahra. Two-Year Follow-Up Analysis of Telaprevir-Based Antiviral Triple Therapy for HCV Recurrence in Genotype 1 Infected Liver Graft Recipients as a First Step towards Modern HCV Therapy, Volume 2016 (2016), Article ID 8325467. – 8 p.
7. Youssef Alhmada, Denis Selimovic, Fadi Murad, Sarah-Lilly Hassan, Youssef Haikel, Mossaad Megahed, Matthias Hannig, Mohamed Hassan Hepatitis C virus-associated pruritus: Etiopathogenesis and therapeutic strategies // *World J. Gastroenterol.* – 2017. – № 23 (5). – P. 743-750.
8. Cuenca-Lopez F., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sofosbuvir and ledipasvir for the treatment of hepatitis C / F. Cuenca-Lopez, A. Rivero, A. Rivero-Juárez // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2017 – № 13 (1). – P. 105–112.
9. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Мн.: Беларусь, 1982. – издание 2-е, перераб. и доп.
10. Дьяченко А. А. Продукция цитокинов при инфекции вирусом гепатита С 118 КДП, / А. А. Дьяченко, А. Г. Дьяченко. – Новосибирск: СибВО; Сумы: Сумский госуниверситет, 2000–2015.
11. Маммаев С. С. Н. Роль профиброгенных цитокинов в формировании фиброза печени у больных хроническим гепатитом [Электронный ресурс] / С. С. Н. Маммаев, А. А. Мусхаджиев, Ш. Р. Рамазанов // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2013. – Т. 8, № 4. Режим доступа – <http://cyberleninka.ru/article/n/rol-profibrogennyh-tsitokinov-v-formirovaniifibroza-pecheniu-bolnyh-hronicheskim-gepatitom-s-ixzz4a3uJSNcm>
12. Хаитов Р. М. Иммунология / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатова, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000.

Таблица 3. Цитокины в сыворотке крови пациентов, инфицированных вирусом гепатита С

Показатели	Группы		
	Контроль (n=16)	ВГС-носители (n=35)	ВГС-больные (n=44)
ИЛ-8, пг/мл	35,6±2,3 (10–48)	79,2±5,3 (45–126) ***	115,1±8,1 (57–174) ***
ФНО-α, пг/мл	25,8±4,7 (4–76)	103,9±6,6 (56–172) ***	218,9±10,6 (124–294) ***
ТФРβ-1, нг/мл	1,83±0,36 (0,1–3,6)	2,42±0,25 (0,3–4,1)	53,71±5,41 (15,2–96,4) ***

Примечание. Статистически значимая разница со средними показателями группы по сравнению с контролем: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Резюме

Порівняння деяких біохімічних показників і цитокінів при вірусному гепатиті С

Л. Р. Талишинська

Азербайджанський медичний університет

Метою даної роботи було дослідження діагностичного і прогностичного значень біохімічних показників крові і рівня деяких цитокінів при вірусному гепатиті С. Проведено дослідження сироватки крові групи пацієнтів – 33 носії ВГС та 44 – хворі на ВГС. З діагностичною метою проводили колоїдні проби, визначали активність печінкових ферментів і концентрацію білірубину, які характеризують функціональний стан печінки, а також концентрацію цитокінів. Було визначено, що у хворих на ВГС, порівняно з носіями ВГС, концентрація білірубину і активність печінкових ферментів були вищими. Зміна колоїдних проб свідчить про зниження синтетичної функції печінки. Підвищення рівня фактора некрозу пухлин-альфа (TNF- α), що характеризує запальний процес, вказує на елімінацію пошкоджених у результаті некрозу і апоптозу клітин; підвищення концентрації трансформуючого фактора росту (TGF- β_1), який вважають основним медіатором фіброгенезу, свідчить про появу фібротичних процесів у печінці.

Ключові слова: носії вірусу гепатиту С, хворі на вірусний гепатит С, визначення біохімічних показників, функціональний стан печінки.

Summary

Comparative study of some biochemical measurements and cytokines in viral hepatitis C

L. R. Talishinskaya

Azerbaijan Medical University

The aim of this study was to observe the diagnostic and prognostic value of biochemical measurements of blood and some cytokines in viral hepatitis C. The serum of blood of 33 HCV carriers and 44 HCV ill patients were subjected to colloidal tests, after which were determined the activity of marker enzymes and the concentration of bilirubin, characterizing the functional state of the liver, and also the concentration of cytokines. It was found that the concentration of bilirubin and the activity of marker enzymes are higher in HCV ill patients than in HCV-carriers. The change in colloidal samples indicates a decrease in the synthetic function of the liver. An increase in the level of tumour necrosis factor (TNF- α), which characterizes the inflammatory process, indicates the elimination of cells damaged by necrosis and apoptosis / an increase in the concentration of the transforming growth factor (TGF- β_1), which is considered the main mediator of fibrogenesis, proves the onset of fibrotic processes in the liver.

Key words: Hepatitis C virus carriers, patients with viral hepatitis C, determination of biochemical parameters, functional state of the liver.