

ОФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Е.А. ВАГНЕРА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ПАДУЧЕВА

Светлана Вячеславовна

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

14.01.04 – Внутренние болезни

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор
Щёктова Алевтина Павловна
доктор медицинских наук, профессор
Булатова Ирина Анатольевна

Пермь – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РОЛИ ВОСПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ.....	13
1.1. Цирроз печени как многофакторное заболевание.....	13
1.2. Роль воспаления при развитии цирроза печени.....	15
1.3. Взаимосвязь цитокинов с клиническими проявлениями и классами тяжести цирроза печени.....	18
1.4. Значение в формировании цирроза печени полиморфизма генов цитокинов.....	21
1.5. Современные методы диагностики цирроза печени.....	24
Глава 2. ОБЪЕМ НАБЛЮДЕНИЙ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
2.1. Дизайн исследования.....	31
2.2. Клинические методы обследования.....	34
2.3. Лабораторные и расчетные методы диагностики.....	36
2.4. Инструментальные методы исследования.....	44
2.5. Методика статистического анализа результатов.....	44
Глава 3. КЛИНИКО – ЛАБОРАТОРНЫЕ СИНДРОМЫ У БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ И КЛАССОМ ТЯЖЕСТИ ЦИРРОЗОВ ПЕЧЕНИ.....	48
3.1. Клинические проявления ЦП при различных этиологических вариантах.....	48
3.2. Лабораторные тесты у больных циррозом печени.....	59
3.3. Сравнительный анализ лабораторных показателей при циррозах печени вирусной, алкогольной и смешанной этиологии.....	67
3.4. Сопоставление лабораторных показателей у больных циррозом печени вирусной этиологии.....	71

3.5. Оценка лабораторных тестов в зависимости от класса тяжести цирроза печени.....	75
Глава 4. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ СТРАТИФИКАЦИИ КЛАССА ТЯЖЕСТИ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ.....	84
4.1. Диагностическая ценность определения уровней концентрации цитокинов	84
4.2. Оценка значений расчётных индексов APRI и MELD.....	84
4.3. Клинические примеры.....	90
Глава 5. ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПАТОГЕНИТИЧЕСКИХ ЗНАЧИМЫХ МОЛЕКУЛ.....	93
5.1. Анализ полиморфизма генотипов исследуемых генов.....	93
5.2. Распределение генотипов в зависимости от пола пациентов, этиологии и класса тяжести цирроза печени	95
5.3. Влияние генетических маркеров на риск развития цирроза печени.....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ВЫВОДЫ.....	118
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	120
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСТ	аспартатаминотрансфераза
АЛТ	аланинаминотрансфераза
АФП	альфа-фетопротеин
АЦП	алкогольный цирроз печени
ВГВ	вирусный гепатит В
ВГС	вирусный гепатит С
ГГТП	гамма-глутамилтранспептидаза
СРБ	С-реактивный белок
ИФА	иммуноферментативный анализ
МНО	международное нормализованное отношение.
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПТИ	протромбиновый индекс
ХГВ	хронический гепатит В
ХГС	хронический гепатит С
ХГД	хронический гепатит Д
ХГ–микст	хронический гепатит В, С и Д
ЦП	цирроз печени
ЩФ	щелочная фосфатаза
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота

APRI	индекс соотношения аспартат-аминотрансферазы (АСТ) к числу тромбоцитов (англ. Aspartate-aminotransferase-to-Platelet Ratio Index)
G-CSF	гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (англ. Granulocyte colony-stimulating factor)
IFN- γ	интерферон γ (англ. interferon)
IgG	иммуноглобулин G (англ. Immunoglobulin G)
IL-1 β , 2	интерлейкин-1 β ,2 (англ. interleukin)
MELD	модель для оценки конечной стадии хронических заболеваний печени (англ. Model for end-stage liver disease)
SNP	однонуклеотидный полиморфизм генов (англ. Single nucleotide polymorphism)
TNF- α	фактор некроза опухоли альфа (англ. tumor necrosis factor)
VEGF	вазкулоэндотелиальный фактор роста (англ. Vascular endothelial growth factor)
VEGFA	полиморфизм G634C гена VEGFA (<i>rs2010963</i>) (G634C)
TNF (G4682A)	полиморфизм 4682 G>A гена TNF (<i>rs1800629</i>)
IL-6 (C174G)	полиморфизм -174 C>G гена IL-6 (<i>rs1800795</i>)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время цирроз печени (ЦП) является значимой проблемой медицины во всем мире [3,5,6,11,23,36,60]. Высокая степень инфицированности вирусными гепатитами (ВГ) и алкоголизации населения, большой процент хронизации процесса, поздняя диагностика, дорогостоящее лечение приводят к тому, что в течение ближайших лет ожидается увеличение роста заболевания ЦП [9,13,23,37,59]. В мире количество больных достигает 20 млн. человек. ЦП на протяжении последних лет входит в число шести основных причин смертности трудоспособного населения [16,34,45].

Развитие клинической картины болезни проходит ряд последовательных клинических стадий с различной продолжительностью по времени. Скудная клиническая картина на ранней стадии заболевания и многообразие клинической картины на стадии декомпенсации [3,6,120] усложняют своевременную диагностику и адекватную терапию [13, 99]. Возникновение таких осложнений, как бактериальный перитонит, кровотечение из расширенных вен пищевода и желудка, печеночная энцефалопатия, пневмония, гепаторенальный синдром, мочевиная инфекция, сепсис, позволяют относить больных ЦП в группу с высоким риском летальности [4,5,13,45,61]. Средняя выживаемость пациентов ЦП в течение пяти лет достигает 44-55% [26,73]. Частым исходом ЦП различной этиологии является гепатоцеллюлярная карцинома, злокачественное заболевание, характеризующаяся быстрым ростом и высоким риском смертельного исхода [29,36,67].

Прогноз прогрессирования заболевания зависит от многих причин, в том числе избыточная масса тела, употребление алкоголя, гипергликемия, повышенный уровень железа, возраст, фенотип и генотип человека [11,13,60,61].

По современным представлениям, в основе патогенеза ЦП стоит цирроз-ассоциированная иммунная дисфункция, включающая множество механизмов, приводящих к иммунному дефициту и воспалению [61,64,69,80,81,82,95,99].

Ключевым показателем степени активности воспалительной реакции является определение цитокинов как медиаторов воспаления [19,27,52,92,104,106,120,122]. Изучение роли ряда цитокинов и внедрение их определения в крови у пациентов с ЦП наравне с результатами клинических и биохимических исследований могут быть полезны для своевременной ранней диагностики заболевания [46,50].

Выработка цитокинов строго регулируется генетическими факторами, что приводит к возможным вариантам изменчивости и приспособляемости молекул к различным физиологическим и патологическим воздействиям. Изучение отличия последовательности нитей ДНК в размере одного нуклеотида, которое может влиять на формирование и интенсивность иммунного ответа, поможет оценить риск осложнений и тяжесть течения болезни [1,12,27,40,56,58,63,75].

Несмотря на то, что лабораторные методы диагностики широко применяются, их значение при циррозе печени остается недостаточно исследованными [3,4,6,10,18,37].

На сегодняшний день есть потребность в создании комплекса лабораторных тестов, включающих в себя различные биомаркеры, с помощью которых можно адекватно оценить состояние больного и спрогнозировать риск развития ЦП [3,4,17,24,54,55].

Перечисленные причины определяют актуальность выполненной диссертационной работы по изучению клинико-патогенетических и генетических особенностей при ЦП.

Цель работы – 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.

Гипотеза – независимо от этиологического фактора клинические проявления и прогрессирование ЦП взаимосвязано с рядом провоспалительных цитокинов и других молекул, активно участвующих в патогенезе заболевания, моделируется особенностями генов этих молекул и обуславливает возможности использования лабораторных показателей для оценки риска развития, прогрессирования ЦП и стратификации класса тяжести заболевания.

Задачи исследования

1. Оценить клинико-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- 1β (IL- 1β), 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- α , 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 исследования

Определены клиничко-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 интерлейкина-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 клиничко-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 цирроза печени, 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 в практику. 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», ОКБ на станции Пермь-2 ОАО «РЖД» и ООО лаборатория «Медлабэкспресс» г. Перми.

Личный вклад автора. Диссертант лично участвовала в планировании, организации и проведении исследования по всем разделам работы. Автор анализировала обзор научной литературы, участвовала в разработке дизайна обследования, формировании цели и задач исследования. Автор лично проводила и контролировала сбор биологического материала, определение лабораторных показателей. Автором лично проводился анализ полученных клинических и лабораторных результатов, разработан алгоритм диагностики, позволяющий оценить класс тяжести и генетический риск развития цирроза. Вся полученная информация статистически обработана и систематизирована лично автором.

Апробация работы и публикации. Результаты работы представлены на Краевой научно-практической конференции «Инновационные технологии лабораторного анализа и новые возможности их клинического применения» (Пермь, 2014); на Научной сессии ПГМА им. академика Е.А.Вагнера «Актуальные вопросы лабораторной диагностики» (Пермь, 2015); на Международном научном конгрессе, посвященном 100-летию Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера «Актуальные вопросы медицины – 21 век» (Пермь, 2016); на XI Национальном конгрессе терапевтов (Москва, 2016), на Межрегиональной научно-практической конференции «Использование новых технологий и инновационных решений в практике клинко-диагностических лабораторий» (Пермь, 2017), на IV конференции иммунологов Урала (Челябинск, 2017), на Краевой научно-практической конференции «Использование новых технологий и инновационных решений в практике клинко-диагностических лабораторий» (Пермь, 2018), на форуме специалистов лабораторной медицины Пермского края «Современные подходы к организации лабо-

раторной службы, профессиональные стандарты и образование, перспективные технологии в медицинской практике» (Пермь, 2019).

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 7 – в рекомендуемых ВАК изданиях. Зарегистрирован один патент «Способ диагностики степени тяжести цирроза печени смешанной этиологии» № 2632101 от 02.10.2017 г. по заявке № 2016117613 от 04.05.2016г. Бюл. №28.

Структура и объем диссертации. Диссертация представляет собой рукопись на русском языке объемом 146 страниц машинописного текста, 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, 28 рисунком и 3 клиническими примерами.

Диссертация выполнена на кафедре клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России (ректор – заслуженный деятель науки, профессор И.П. Корюкина).

Исследование было проведено в соответствии с Хельсинской декларацией на проведение научного исследования с участием человека (Хельсинки, Финляндия 1964 г.) и одобрено Этическим комитетом ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера (разрешение этического комитета от 29.08.2017г.). От каждого пациента получено добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании. При выполнении работы, написании статей, монографий и изобретений конфликта интересов не возникало.

Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РОЛИ ВОСПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

1.1. Цирроз печени как многофакторное заболевание

Несмотря на достигнутый прогресс в диагностических и терапевтических методах управления хроническими заболеваниями печени, цирроз печени (ЦП) остаётся значимой социально-экономической проблемой здравоохранения во всем мире [3,6,7,10,11,34,36].

По данным ВОЗ, более 20 миллионов человек в мире страдают ЦП [16,36,46]. В странах с развитой инфраструктурой ЦП входит в число шести основных причин смертности трудоспособного населения среди неопухолевых заболеваний [24,25,26,29]. По эпидемиологическим исследованиям в России ежегодно количество больных с ЦП возрастает на 200 тысяч в год [34,36,46].

Среди основных причин цирроза печени – вирусные гепатиты, алкоголь, неалкогольная жировая болезнь печени и неалкогольный стеатогепатит [5,6,11,34,45]. По данным ВОЗ (2017г.), в мире заражено гепатотропными вирусами около 2 млрд. человек, среди них хронической формой гепатита С страдают 71 миллион человек [16,59]. Риск развития ЦП у лиц с хроническим гепатитом С (ХГС) составляет 15–30% в течение 20 лет [7,59,62].

Актуальной проблемой являются алкоголь-ассоциированные заболевания печени. В настоящее время злоупотребление алкоголем является ведущим этиологическим фактором развития цирроза печени. По официальным данным в России зарегистрировано более 10 миллионов больных алкоголизмом, из них более 500 тысяч страдают ЦП, который развивается в среднем через 10–20 лет злоупотребления алкоголем [9,11,13,39,51]. Особенно отличаются тяжелым течением сочетанные формы алкогольно-вирусных циррозов печени, среди которых отмечаются быстро прогрессирующие формы. Пятилетняя выживаемость больных со смешанным циррозом достигает 43%. Они же чаще трансформируются в гепатоцеллюлярную карциному [9,39,51,67].

Прогноз развития клинической картины ЦП зависит от ряда причин: своевременной диагностики, правильного выбора тактики лечения и лечения осложнений. По данным литературы, прогрессирующие факторы риска, такие как избыточная масса тела, гипергликемия, употребление алкоголя, иммуносупрессия, повышенный уровень железа, фенотип человека, его возраст и пол имеют большое прогностическое значение [11,13,60,61]. По данным литературы, имеются современные экспериментальные и клинические доказательства обратимости цирроза печени на ранних стадиях заболевания [36,92].

По клиническим проявлениям различают компенсированный цирроз, который характеризуется появлением портальной гипертензией и отсутствием осложнений. Часто бессимптомное течение и практически полное отсутствие осложнений на начальных стадиях заболевания усложняют раннюю диагностику ЦП [4,13,44,61]. Заболевание на данном этапе болезни имеет низкий риск декомпенсации и смерти [72]. На более поздних стадиях декомпенсации ЦП характеризуется многоступенчатым возникновением осложнений и многообразием клинической картины [13,18,44]. К наиболее частым осложнениям относятся асцит, бактериальный перитонит, внутренние кровотечения, энцефалопатия, мочевые инфекции, гепаторенальный синдром, пневмонии [28,40,73]. В финале развивается тяжёлый асцит, печёночная энцефалопатия, почечная недостаточность, присоединяется гепатопанкреатический синдром, кишечные кровотечения, миокардиодистрофия, лихорадка и кома, наступает полиорганная недостаточность и летальный исход [13,32,97]. В течение первого года от момента появления асцита выживают до 75% пациентов, в течение пяти лет – менее 50% [26,72].

Наиболее частым встречающимся осложнением цирроза является асцит. Регистрируется практически у 80-90% больных ЦП, хотя может быть и проявлением других заболеваний, таких как опухоли, преимущественно желудочно-кишечной локализации, сердечная недостаточность, туберкулез и другие при-

чины. Различают асцит, легко поддающийся лечению, не рефрактерный, как правило, чаще выявляется при УЗ – исследовании, и рефрактерный асцит, который можно выявить визуально. По мере нарастания патологических изменений частота и отсутствие ответа на лечение является прогностически неблагоприятным признаком [25]. Синдром портальной гипертензии отмечается у всех больных, характеризуется повышением гидростатического давления в синусоидах печени, за счет структурных изменений органа и увеличением кровотока [18,25,31]. Гепаторенальный синдром составляет около 10-15% у больных и чаще регистрируется на стадиях декомпенсации, как признак тяжелой почечной патологии на фоне печеночной недостаточности [10,25,28]. Спонтанный бактериальный перитонит возникает вследствие дисфункции лимфоидной ткани кишечника. В результате происходит обсеменение, патогенными молекулами пространства брюшной полости, попадая в кровь, вызывая общую бактериемию. Печеночная энцефалопатия регистрируются практически у каждого больного в разной степени выраженности. Отмечают четыре стадии развития энцефалопатии, начиная от лёгких нарушений сознания, вплоть до полной потери - комы. Кровотечение из варикозно-расширенных вен пищевода и желудка является одной из частых причин смерти больных и составляет около 60% [25,28].

Особое место среди осложнений ЦП занимает ГЦК, составляющая 3–6 % от всех смертей, связанных с раком [29,51,67]. Это одна из распространенных злокачественных опухолей печени, характеризующаяся быстрым ростом и высоким риском смертельного исхода [24,36].

1.2. Роль воспаления при развитии цирроза печени

Печень является органом, ответственным за гомеостаз всего организма, источником биологических активных веществ, принимающих участие в реализации различных обменных и иммунных процессах [72,104]. За счет выработки белков острой фазы, компонентов комплемента, иммунных клеток и лимфоцитов печень участвует в постоянном контроле над чужеродными патогенными

молекулами, поступающих из общего кровотока и кишечника. Воспалительная реакция служит необходимой реакцией организма для осуществления контроля над повреждением и восстановлением тканей печени [61, 92]. В ходе длительного поражения ткани печени, усиленного фиброгенеза и нарушения сосудистой архитектоники, в основе которых лежат сложные реактивные изменения ретикуло-эндотелиальной системы, дающие толчок воспалительным реакциям, выходящим за пределы допустимых границ, происходит нарушение функции иммунного надзора [20,32,72]. Одновременно запускается каскад сигнальных реакций, приводящих к активации антигенпредставляющих клеток (клетки Купфера, синусоидальные эндотелиальные клетки, дендритные клетки) и их рецепторов, а также экспрессии генов и синтезу широкого спектра цитокинов, хемокинов, молекул клеточной адгезии и иммуномодуляторов [20,32,61,64,69]. Вовлекаясь в патологический процесс, моноцитарные печеночные макрофаги приобретают патологический фенотип, схожий с клетками Купфера, и становятся способными к усиленной пролиферации клеток [81,92,122], обеспечивая замену макрофагов воспалительными фагоцитами [101,122]. Для поддержания гомеостаза печень содержит несколько популяций моноцитов и дендритных клеток, которые составляют до 90% от общей численности макрофагов всего организма [69, 86,92]. Клетки Купфера, также относящиеся к системе макрофагальных моноцитов, образуются из циркулирующих моноцитов, попав в печень, и локализуются в синусоидальном пространстве, отслеживая экзо-и эндотоксины [20,69]. При повреждении ткани клетки Купфера опосредовано через активацию кислородных радикалов и цитокинов начинают стимулировать фиброгенез, поддерживая звездчатые клетки Ито в активированном состоянии, способствуя развитию фиброза и регулируя приток циркулирующих иммунных клеток крови [80,86,104,112]. Звездчатые клетки (адипоциты, клетки Ито) расположены в пространстве Диссе, относятся к клеткам синусоидов и являются основным местом выработки фиброцитов [20,32,83]. При их активации наступает накопление клеток, увеличение производства матрицы, повышение сокра-

тимости, снижение деградации внеклеточного матрикса, высвобождение профиброгенных цитокинов и развивается миофибробластный фенотип [44,83]. Образование волокнистой ткани изменяет строение печеночной дольки, нарушая метаболические обмены между гепатоцитами и синусоидами крови, и приводят к нарушению функции печени обезвреживать процессы образования токсинов, регуляция выработки углеводов, липидов и белков, и других важных соединений [39,44,69,81,92,120]. Патологические изменения клеток приводят к нарушению целостности структур эндотелия синусоидов, формируя ситоподобный фенестрируемый эндотелий [20, 61]. Тем самым обеспечивая нарушение внутрипеченочной гемодинамики, приводящей к портальной гипертензии, желудочно-кишечным кровотечениям и другим осложнениям [10].

Кроме того, в печени находятся различные популяции лимфоцитов, ответственных за приобретенный иммунитет и реализацию иммунного ответа [61]. Наиболее выраженные изменения касаются Т-клеточного иммунитета, за счет снижения зрелых форм Т-лимфоцитов [8,44,86,106,122]. Циркулирующие НК-клетки, составляющие 25-40% от общего количества внутрипечёночных лимфоцитов печени, повреждаются при циррозе. Эти клетки играют как полезную роль, обладая повышенной цитолитической активностью, так и участвуют в повреждении ткани печени, замедляя регенерацию [73].

По мере развития ЦП в патологический процесс вовлекается кишечник, благодаря лимфоидной ткани, постоянно участвующий в бактериальной транслокации ткани [28,72]. Из-за повышенной бактериальной нагрузки происходит дефект барьерной функции кишечника и в кровоток начинают поступать продукты жизнедеятельности бактерий, вызывая дополнительный очаг воспаления [21]. В результате, кишечник становится источником активированных иммунных клеток, таких как моноциты, дендритные клетки, Т-лимфоциты и провоспалительные цитокины, является пусковым механизмом в возникновении си-

стемного воспалительного ответа, сепсиса, вызывая полированную недостаточность [87,120,122].

Динамические изменения иммунной системы, микроциркуляторные расстройства, нарушение барьерной функции кишечного эпителия, вторичная функциональная недостаточность внутренних органов приводят к выраженным полиорганным нарушениям [21, 120]. В дальнейшем развитие заболевания рассматривается как синдром «цирроз-ассоциированной иммунной дисфункции», который относится к сочетанию иммунной дисфункции и системного воспаления [21,61,72,73,95,106]. Дисфункция приобретенного иммунитета у пациентов с ЦП характеризуется депрессией клеточного и активацией гуморального иммунитета [65,70,94,122].

Несмотря на то, что формирование и прогрессирование ЦП, независимо от этиологического фактора носят общие механизмы патологического патогенеза, в научных исследованиях зарубежных авторов (2015) отмечено, что воспалительный статус алкогольного цирроза носит более выраженный провоспалительный характер по сравнению с циррозом в исходе вирусного гепатита С [91]. Авторами установлено, что прямое действие этанола усиливает цитотоксический эффект и бактериальную проницаемость кишечника, способствуя более быстрому развитию асцита [91].

Таким образом, наше исследование позволит оценить клинические проявления ЦП вирусной, алкогольной и смешанной этиологии для приоритетного выбора тактики введения пациентов.

1.3. Взаимосвязь цитокинов с клиническими проявлениями и классами тяжести цирроза печени

Ключевая роль в развитии воспаления принадлежит цитокинам как основным регуляторам межклеточных взаимодействий, участвующих во многих обменных, иммунологических, защитных реакциях [21,37,46,52,67,69]. Цитокины могут синтезироваться любыми активированными ядродержащими клет-

ками организма, но в большей степени клетками иммунной системы: Т-лимфоцитами, макрофагами, лейкоцитами, а также эндотелиоцитами, гепатоцитами, тромбоцитами и другими клетками, активно участвуют в индукции острофазовых белков [46,52,72]. Медиаторы иммунного ответа обладают общими свойствами, позволяющие относить их к группе плеiotропных веществ, это низкая молекулярная масса, высокая биологическая активность, отсутствие органоспецифичности, взаимозаменяемость, участие в проведении сигнала [46]. Здоровая печень постоянно вырабатывает цитокины в малых количествах для поддержания иммунного гомеостаза организма. В основном они действуют локально в очаге воспаления и в лимфоидных органах, но при выраженном воспалении цитокины могут накапливаться в крови, запуская каскад воспалительных реакций, усиливая пролиферацию и изменяя функциональные и морфологические особенности клеток [46,52,72]. Во многих работах отмечается их взаимосвязь со степенью тяжести при различных патологических состояниях [46,48,94].

Зарубежными и отечественными авторами за последние двадцать лет опубликовано множество работ по изучению цитокинового статуса при ЦП [48,52,53,65,67,94], но неоднозначность данных в работах не позволяет определить их значимость для диагностики ЦП.

Ряд авторов установили, что количественное соотношение и степень взаимосвязей между цитокинами IL-2, IL-6, TNF-а определяют стадию компенсации цирроза [50]. А.Г. Скуратов с соавт. (2016) отметили, что повышение концентрации интерлейкина-6, являющегося провоспалительным цитокином, регистрируется на фоне снижения компенсации функции печени и прогрессирования цирроза [47]. В работах зарубежных авторов (2016) были проведены исследования по изучению фенотипов 17 цитокинов, значимых для дифференциации стадии тяжести, и установлено, что провоспалительные цитокины IL-2, IL-6, IL-8 имеют прямую корреляцию и IFN- γ отрицательную корреляцию с тяже-

стью заболевания и наиболее полезны в качестве прогностических биомаркеров [18,66,72]. В статье М. Buck (2014) отмечена значимость воспалительных сывороточных тестов для диагностики портальной гипертензии у больных с ЦП [67]. В работе М. Dirchwolf (2016) установлено, что у пациентов с ЦП в стадии декомпенсации характерны пониженные уровни цитокинов IL-10, IL-12, TNF- α , MCP-1 и IFN- γ как результат чрезмерного воспалительного ответа [72]. Одним из первых при этом включается в реализацию воспалительных и регенераторных реакций TNF- α , который также усиливает пролиферацию эндотелия и синтез коллагена. В ряде работ установлены взаимосвязи уровней TNF- α , IL-6 с функциональными показателями печени и особенностями течения цирроза [27,33,53,67,87,105,107]. В работе Б.Н. Левитана с соавт. (2017) установлено, что повышение TNF- α и его рецепторов ассоциируется с активностью воспаления и классом тяжести по шкале Чайлд–Пью [30]. Показано, что гиперпродукция TNF- α является признаком персистирующего системного воспаления при циррозе и свидетельствует о прогрессировании заболевания [47,61].

В работе группы авторов на фоне прогрессирования ЦП отмечается статистически значимое повышение уровня концентрации IL-6 в сыворотке крови в зависимости от тяжести заболевания [48, 67]. В исследовании, проведенном группой зарубежных авторов, определена роль IL-6 как маркера для прогнозирования смертности у пациентов с циррозом [119]. Прямое измерение уровня IL-6 в сыворотке крови как прогностического фактора может помочь выбирать наиболее актуальную терапию в ранние сроки и оценить прогнозируемые исходы [88,119]. На основании многофакторного дискриминантного анализа, проведенного группой авторов, установлено, что повышение содержания интерлейкина-6 в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С является независимым фактором прогрессирования заболевания [27].

По данным литературы, отмечена роль сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в патогенезе повреждения эндотелиальных клеток печеноч-

ных синусоидов и возможность его использования для максимально выраженного фиброза печени с высокой чувствительностью и специфичностью [58].

В работе В.В. Базарного с соавт. (2013) при оценке значимости теста гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) были получены данные, позволяющие судить, что повышенные концентрации имеют прогностический неблагоприятный признак [2]. Хотя в исследовании С.Н. Крутикова с соавт. (2011) увеличение G-CSF и IL-1 регистрировали у лиц, не имеющих транзиторную бактериемию крови, а у пациентов с бактериемией отмечали достоверное снижение показателей [28].

Таким образом, нет единого мнения о характере изменения цитокинового статуса при ЦП. Новое исследование улучшит понимание патогенеза и приведет к совершенствованию диагностики и терапии.

1.4. Значение в формировании цирроза печени полиморфизма генов цитокинов

В настоящее время нет четкого представления о причинах различной скорости формирования ЦП. Известно, что на развитие клинических проявлений этого процесса оказывают влияние однонуклеотидные замены в кодирующих локусах генов [1,12,19,29]. Однако данные, имеющиеся в литературе по исследованию генетического профиля, часто противоречивы, что может быть связано с этническими особенностями пациентов, проживающих в различных географических районах.

В последние годы для поиска генетических маркеров заболеваний за рубежом стал активно применяться метод геномного секвенирования, в ходе которого проводится полный анализ генетического материала. В ходе одного крупного исследования, проведенного в 2006 г. в США, было проанализировано 24 823 случая полиморфизма у 1 468 пациентов с ЦП в исходе ХГС и составлена панель предикторов риска развития ЦП, в которую вошло 7 полиморфизмов кандидатных генов: AZIN1 (Chr8) с генотипом риска GG, TLR4 (Chr9)

CC, TRPM5 (Chr11) CT,CC, AP3S2 (Chr15) AG,AA, NVL (Chr1) GG, STXBP5L (Chr3) AG,AA, AQP2 (Chr12) GG [34]. В работе К.Р. Дудиной (2011) отмеченные полиморфизмы показали значимость у больных циррозом вирусного и алкогольного генеза [23].

Учитывая роль патогенетически значимых молекул в формировании иммунного ответа, изучение полиморфизма нуклеотидов в генах является важной задачей для стратегии этапов ранней профилактики ЦП [19].

Наиболее изучен полиморфный участок гена TNF- α в точке -308G/A, находящийся в 6-й хромосоме [110]. Существуют предположения о том, что TNF- α может служить генетическим маркером исходов вирусного гепатита С, хотя результаты по разным источникам противоречивы, что может быть связано с этническими особенностями пациентов и различной величиной выборок. Выявлено влияние полиморфизма - 238 и - 308 гена TNF на активность ХГС [62]. По некоторым данным зарубежных авторов (2013г.), среди больных хроническими вирусными гепатитами В и С носители разных генотипов маркера G-308A гена TNF- α отличались по уровню продукции одноименного цитокина. Так, уровень TNF (G-308A) имел тенденцию к снижению в направлении от гомозигот GG к гомозиготам AA, у гетерозигот GA отмечались противоречивые уровни TNF [62]. В некоторых исследованиях связывают наличие минорной аллели А в генотипе (G-308A) с повышенным риском развития рака печени, с высоким риском фиброза печени и более тяжелым повреждением печени [35,100]. В работе А.Г. Скуратова с соавт. (2017) отмечена связь полиморфизма гена TNF с повышением относительного риска развития ЦП [47].

Ген IL-6 имеет более ста одиночных нуклеотидных полиморфизмов и расположен на хромосоме 7p21 [65]. В ряде работ было показано, что наличие единственного нуклеотида G/C полиморфизма в промоторе - 174 IL-6 связано с транскрипцией гена IL-6 и, как следствие, к контролю уровня продукции IL-6 [75,96]. Впоследствии для этого полиморфизма были идентифицированы два

фенотипа: фенотип с высоким уровнем продукции IL-6 с генотипами – 174 G/G и – 174 G/C и фенотип с низким уровнем продукции данного цитокина (генотип -174 C / C) [75].

Молекулярно-генетические исследования показали, что существуют этнические различия в частоте аллеля – 174 G. Азиатские популяции имеют гораздо более низкие частоты аллеля – 174 C, чем европейские [71].

Рядом авторов исследовалась возможная корреляция между наличием полиморфизма –174 G/C IL-6 и уровнем заболевания печени [78,79]. В работе С.М. Абдуллаева с соавт. (2007) было показано, что генотипы гена IL-6–174GC и –174CC имеют связь с быстро прогрессирующим течением ХГС [1]. При этом в исследовании, проведенном в Томской области, выявлен генотип 174GG, имеющий взаимосвязь с высокой степенью активности воспалительного процесса. Однако в других исследованиях у пациентов с хроническим гепатитом С не найдено достоверных значений полиморфизма гена IL-6 в развитии фиброза [48]. Баррет и др. отметили, что носители высокопродуктивных генотипов (генотипы IL-6 – 174 GG и – 174 GC) имели значительно более высокие показатели устойчивого вирусологического ответа, чем пациенты с низкопродуктивным генотипом – 174 CC [48].

Исследование в бразильской и японской популяциях пациентов с ХГВ не выявило значительных различий в полиморфизме IL-6 – 174 по аллелям, генотипам и фенотипам [71]. В популяции испанцев не было обнаружено статистически значимых ассоциаций между полиморфизмом – 174 G/C IL-6 и риском развития алкогольного ЦП [71].

Экспрессия белков семейства VEGF стимулируется множеством проангиогенных факторов и факторами внешней среды. Данные по анализу полиморфизма гена VEGF довольно разрозненны, не все однонуклеотидные замены в локусах генов функционально значимы [56]. По некоторым данным, носительство аллеля С гена VEGFA (G–634C) в виде гомозиготы CC является фак-

тором риска хронического гепатита С, прогрессирующий тип течения ХГС ассоциирован с наличием аллеля –634С гена VEGFA, а медленное течение заболевания связано с генотипом гена –634 GG гена VEGFA [56].

Всё это требует дополнительного уточнения ассоциации полиморфизма генов *TNF (G4682A)*, *IL-6 (C174G)* и *VEGFA (G-634C)* с формированием и прогрессированием ЦП различной этиологии.

1.5. Современные методы диагностики цирроза печени

На современном этапе диагностика ЦП основывается на совокупности различных методов исследования с целью уточнения изменения ткани печени и активации воспаления [3,4,17,18,26,30,54].

Сбор амнестических данных является важным звеном в выборе тактики введения пациента. Основными жалобами при ЦП являются: слабость, боли в области живота, повышение температуры, диспепсия, зуд кожи, появление сыняков на теле, отёчность нижних конечностей, клинические проявления которых часто варьируют и обусловлены нарушением печеночной недостаточности, портальной гипертензией и присоединением различных осложнений. При осмотре пациентов отмечаются сосудистые изменения, похудание, желтушность кожных покровов и склер, отечность, увеличение живота и болезненность при пальпации, появление венозных коллатералей на более поздних стадиях [25]. Хотя цирроз часто протекает латентно и клиника не дает достаточных критериев для ранней диагностики [3,5].

К наиболее надежным методам лабораторной диагностики относится пункционная биопсия печени – инвазивный метод, позволяющий определить стадию фиброза печени, степень выраженности воспалительного процесса и индекс гистологической активности. Однако у больных с ЦП проведение биопсии ограничено наличием портальной гипертензии и угрозой кровотечений, а также высоким риском осложнений и летальности. Возможные расхождения

результатов и инвазивность процедуры не позволяют использовать морфологическое исследование для динамического наблюдения и диагностики стадии заболевания [3,4,17,55,59].

Из лабораторных методов диагностики широко распространены стандартные «печеночные» пробы, такие как билирубин, холестерин, общий белок, альбумин, активность трансаминаз, протромбиновый индекс, которые позволяют выявить функциональные нарушения печени, но не являются специфическими маркерами ЦП [3,4,10]. Кроме того, в литературе отмечено, что активность ферментов при ЦП может быть различна и по мере прогрессирования процесса уровень трансаминаз снижается [4,17]. Повышение активности гамма-глутамилтранспептидазы может отмечаться у людей, злоупотребляющих алкоголем, и при отсутствии активности других ферментов [4,17].

Гематологические тесты на выявление лейкоцитоза или лейкопении, анемии, тромбоцитопении, лимфопении и моноцитоза при ЦП носят полифакторный характер и являются неспецифическим признаком для больных [20,69].

Применение прямых сывороточных маркеров фиброза, таких как гиалуроновая кислота, коллагеназы, матриксные металлопротеиназы и тканевые ингибиторы металлопротеиназ не нашло широкого применения для диагностики ЦП [3,4,10,54].

К настоящему времени для улучшения диагностической точности лабораторных тестов разработано около 20 различных индексов и шкал, позволяющих с высокой вероятностью установить наличие фиброза (F4) [8,17,49].

Наиболее простой показатель, используемый для диагностики ЦП, является коэффициент де Ритиса (AAR): соотношение АСТ/АЛТ более 1 предполагает наличие цирроза и имеет сильную корреляцию с морфологической стадией по биопсии [49].

Применение гепатопанелей доказало их высокую эффективность для диагностики стадии фиброза: FibroMax, FibroTest, Hepascore, Fibrometer и ряд других тестов [49,56], включающие определения сывороточных концентраций гаптоглобина, альфа-2-макроглобулина, аполиipoproteина-A1, ГГПТ, АЛТ, билирубина с применением математических алгоритмов [3,4,49,55]. Применение индексов FibroMax, Forns, Fib-4, FibroIndex с расчетом на основании результатов лабораторных тестов АСТ, ГГПТ, гамма-глобулина, тромбоцитов, протромбинового времени позволяет определить стадию фиброза, но не стадию цирроза [4]. Результаты, полученные при использовании данных тестов, не позволяют принять окончательного решения и требуют выполнения морфологических и инструментальных методов диагностики [4,8,10]. Кроме того, из-за высокой стоимости тестов широкого распространения в России они не получили.

С целью исключения первичной гепатоцеллюлярной карциномы сыворотку крови исследуют на содержание альфа-фетопротеина (АФП) [36,41,42,66]. По данным зарубежных исследователей, сывороточный уровень АФП отражает регенераторные процессы печени при некрозе гепатоцитов и имеет взаимосвязь с пролиферацией клеток печени [70]. А также уровень концентрации АФП имеет корреляцию с тяжестью поражения органа и может использоваться в качестве прогностического показателя [41,70,107]. М.И. Рачковский с соавт. (2013) установили взаимосвязь АФП с классами ЦП, но не с активностью патологического процесса, и предложили использовать определение АФП для дифференциации декомпенсации ЦП вирусной этиологии [42].

Несмотря на то, что уровень С-реактивного белка у больных с ЦП вариабелен, его повышенные концентрации сохраняются при ЦП постоянно, поэтому многие авторы считают его применение полезным для диагностики ЦП, особенно на ранних стадиях [22,98], хотя большинство работ посвящено изучению роли С-реактивного белка при септических состояниях [22,95,101].

В работе M.D. Zhu Shao Ming (2017) установлена роль С-реактивного белка при прогнозировании летального исхода больных с ЦП [121].

Для оценки стадии тяжести ЦП и прогноза выживаемости используют классификацию Чайлд–Пью [3,26,49,54,55]. На основе балльной системы с использованием лабораторных тестов и клинических симптомов шкала Чайлд–Пью позволяет оценить печеночную недостаточность и определить стадию заболевания. Кроме того, шкала позволяет прогнозировать долгосрочную выживаемость. При сумме менее 5 баллов выживаемость составляет 6,4 года, больше 12 баллов – сокращается до 2 месяцев [101]. По данным зарубежных авторов (2014г.), сравнительный анализ двух шкал Чайлд–Пью и MELD показал, что Чайлд–Пью может прогнозировать смертность лучше, чем MELD в течение первых 9 месяцев [102]. Однако широко используемый индекс не всегда отражает тяжесть патологического процесса и носит субъективный характер [4,50,102]. Показатели, включенные в эту классификацию: альбумин, протромбиновый индекс и билирубин, не являются специфическими маркерами и не всегда отражают печеночную патологию, выявление асцита, в том числе «преходящего» имеет ряд ограничений и может носить субъективный характер [50].

Наиболее изученным в группе пациентов с хроническими гепатитами С является индекс APRI, определяемый по соотношению АСТ к тромбоцитам. По данным С.-Т. Wai и соавторов (2003г.), индекс APRI выше 0,5 позволяет определять цирроз у ранее нелеченых больных [74,90,114]. Тест показал высокую диагностическую значимость для выявления фиброза и цирроза печени у пациентов с ХГС [55]. В исследованиях, проведенных зарубежными авторами, определены значения индекса APRI для пациентов с ХГС, исключаящие фиброз и цирроз печени с чувствительностью 77% и специфичностью 72% [89]. Хотя по данным других авторов, тест не имеет высокой специфичности и чувствительности для категорий больных с гепатобилиарным поражением алкогольной этиологией [17,55].

С 2002 г. была принята модель MELD (Model for end-stage liver disease) для пациентов с циррозом, ожидающих трансплантацию печени [49,82,85,116]. Применение шкалы MELD позволило прогнозировать летальный исход у пациентов в терминальной стадии ЦП. Неблагоприятный прогноз смертельного исхода заболевания связан с количеством более 18 баллов [11,43,49]. Шкала не зависит от субъективных параметров, от этиологии, от стадии тяжести, а сывороточный уровень креатинина позволяет оценить функциональное состояние почек, хотя оно может зависеть и от другой патологии [49,85]. Но, по данным некоторых исследователей, в группах пациентов с ЦП с низкими показателями шкалы MELD отмечается также высокая смертность [49]. В связи с этим были разработаны различные модификации шкалы MELD, такие как MELD-Na, MELD-XI, Delta MELD, MELD-gender [49], но все они не получили широкого применения в практической медицине.

Для постановки диагноза ЦП необходимо выполнение визуализации изменения структуры органа, для этого широко применяются инструментальные методы, такие как ультразвуковое исследование, позволяющее определить признаки портальной гипертензии [26,31,55], обладающее высокой чувствительностью в диагностике ЦП до 95% [31]. А также эластометрия печени, компьютерная и магнитно-резонансная томография печени, ультразвуковая доплерография сосудов печени и селезенки с расчетом индексов фиброза и портальной гипертензии зарекомендовали себя как дополнительные эффективные методы инструментальной диагностики [1,8,12,18]. Доплерографическое исследование - пульсативный индекс селезеночной артерии и средняя скорость кровотока по воротной вене – прогностическая ценность 89 – 92 %. Точный и воспроизводимый метод оценки тяжести фиброза и цирроза [31]. Как замена метода пункционной биопсии печени может служить метод ультразвуковой эластографии с помощью аппарата FibroScan, хотя и этот метод имеет ограничения [17]. Метод позволяет судить о выраженности ЦП на основании определения плотности ор-

гана, которая возрастает пропорционально накоплению соединительной ткани [17]. Сложность диагностики ЦП при ультразвуковом исследовании заключается практически в полном отсутствии специфических признаков на ранних стадиях заболеваний [42].

Компьютерная томография и магнитно-резонансная томография, как правило, бедны при обнаружении морфологических изменений, связанные с ранним циррозом, но они могут точно продемонстрировать узловатости и долевые атрофические и гипертрофические изменения, а также асцит и варикоз в поздних стадиях заболевания [31,55]. Главными недостатками этих методик является необходимость использования, специализированного и дорогостоящего медицинского оборудования, специально обученного и высококвалифицированного персонала, а также ряд противопоказаний и ограничений для проведения процедуры: например – беременность, ожирение [17, 31,55].

РЕЗЮМЕ

Цирроз печени является исходом многих хронических заболеваний печени. Хотя этиология цирроза многофакторная, поражение органа при хронических диффузных заболеваниях печени имеет общий патогенетический механизм с участием процессов воспаления, фиброгенеза, неоангиогенеза, патологической регенерации с развитием узлов, что закономерно приводит к нарушению архитектоники печени и сопровождается портальной гипертензией, нарушением функций гепатоцитов и разнообразной клинической картиной. Порочный круг патогенеза при ЦП закономерно ведет к фатальным клиническим осложнениям и летальному исходу заболевания.

Высокая степень алкоголизации населения, повышенный риск инфицированности вирусными гепатитами, большой процент хронизации заболевания, прогрессирующее бессимптомное течение на ранних стадиях ЦП позволяют

относить данное заболевание к крайне актуальным проблемам здравоохранения.

В настоящее время диагностика ЦП строится на основании клинических, визуальных, лабораторных методов исследования с использованием расчетных шкал и индексов. Однако применяемые классификации оценки клинической картины ЦП не всегда отражают истинную тяжесть патологических процессов, для функциональных показателей которой характерна высокая изменчивость и субъективность.

Большинство опубликованных работ свидетельствуют о том, что в патологическом изменении печени и развитии цирроза важную роль играют цитокины. Изменения иммуно-воспалительного статуса имеют тесную взаимосвязь с клиническими проявлениями цирроза и его осложнениями, вплоть до развития септического состояния.

Оценка значимости лабораторных тестов, выраженности цирроза и воспаления имеет большое значение для разработки диагностических критериев стадии тяжести заболевания и выбора своевременной тактики введения больных.

В настоящее время ведётся активный поиск генетических маркеров для прогнозирования формирования ЦП. Согласно данным зарубежных и отечественных ученых, однонуклеотидные замены могут оказывать влияние на темпы прогрессирования цирроза печени.

В этой связи изучение значимости воспалительных тестов при ЦП различной этиологии, разработка не инвазивных общедоступных методов диагностики степени его тяжести, в том числе определение аллелей риска прогрессирования генов-кандидатов представляется нам крайне актуальной задачей.

Глава 2. ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

Нами было обследовано 86 больных ЦП вирусной, алкогольной и смешанной этиологии. Пациенты поступали на стационарное лечение в Пермскую краевую клиническую инфекционную больницу (инфекционное отделение № 2), в городскую клиническую больницу №2 имени Ф.Х. Граля г. Перми (гастроэнтерологическое отделение) и в клиническую медико-санитарную часть №1 г. Перми (гастроэнтерологическое отделение). В группу сравнения вошли 70 человек практически здоровых пациентов, проходивших профессиональный осмотр на базе отделенческой клинической больницы на станции Пермь-2.

Критериям включения в исследование соответствовали пациенты с ЦП алкогольной, вирусной и смешанной этиологии, старше 18 лет, имевшие наличие клинических и инструментальных признаков портальной гипертензии, не получавшие противовирусную терапию в течение 6 месяцев и подписавшие информированное согласие на участие в исследовании.

В критерии исключения вошли лица с хроническими заболеваниями в стадии рецидива, онкологические больные; пациенты с хронической сердечной недостаточностью, с сахарным диабетом, беременные и с иной хронической патологией печени.

До начала любых процедур и сбора информации от всех обследованных лиц было получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании, на анализ их анамнестических и диагностических данных. Исследование проводилось с соблюдением требований приказа № 163 (ОСТ 91500.14.0001-2002) Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также Хельсинской декларации всемирной медицинской ассоциации (Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования, 1993) (Экспертная оценка этического комитета от 29.08.2018 г.).

Дизайн исследования представлен следующими этапами: формирование групп больных ЦП, клиническое обследование, лабораторная диагностика, включая расчёт индексов, анализ цитокинового профиля и генетическое тестирование (рис.1).



Рис. 1. Дизайн исследования

По этиологическому признаку пациенты были распределены следующим образом: первую группу составили 50 (58,1%) пациентов с ЦП вирусной этио-

логии (27 мужчин и 23 женщин, средний возраст 52 года). Вторая группа – 20 (23,2%) человек ЦП алкогольной этиологии (14 мужчин и 6 женщин) и третья группа – 16(18,7%) человек смешанной формы (10 мужчин и 6 женщины) (рис.2).

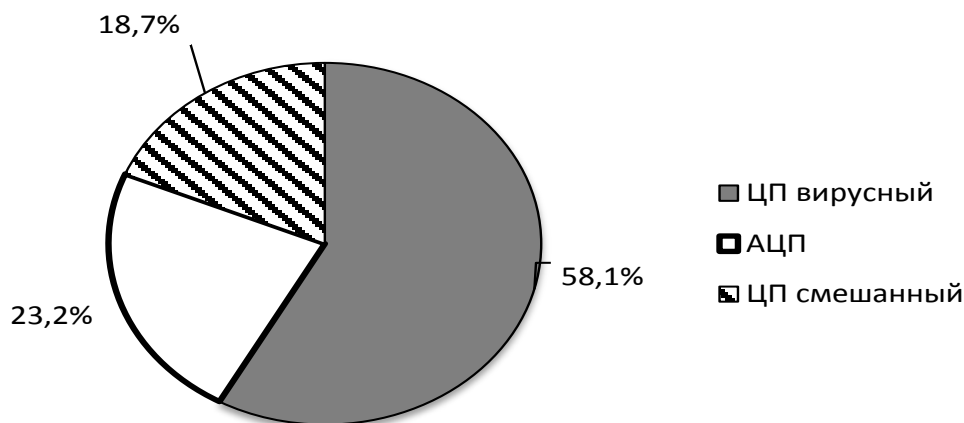


Рис. 2. Распределение пациентов по этиологии ЦП

Группу с вирусным ЦП мы подразделили на три подгруппы. Наиболее значимую группу составили пациенты с вирусным ЦП на фоне гепатита «С» - 30 человек (60%), вторая подгруппа состояла из 10 человек (20%) с вирусным ЦП в исходе гепатита «В», и третья подгруппа состояла из 10 человек (20%) с вирусным ЦП в исходе микст-гепатитов, среди которых 5 пациентов с вирусным ЦП в исходе ХГВ+ХГД, 3 пациента с вирусным ЦП в исходе ХГВ+ХГС и 2 больных–ХГВ+ХГС+ХГД.

Диагноз ЦП был поставлен на основании анамнестических и клинических данных, физикального обследования, инструментального (УЗИ), а также лабораторного исследования. У всех пациентов с ЦП имелись признаки портальной гипертензии, асцит выявлялся в зависимости от класса тяжести ЦП по шкале Чайлд-Пью. По гендерному признаку пациенты составили 44 (50,8%) мужчин и 42 (47,2%) женщин. Пациенты были в возрасте от 29 лет до 78 лет, средний возраст 53 года (табл.1).

Группы были сопоставимы по полу, возрасту и стадиям заболевания и не имели статистически значимых различий между собой. Средняя медиана длительности заболевания 6 лет от момента постановки диагноза.

Таблица 1

Характеристика групп исследуемых больных

Характеристика	Вирусный ЦП (n=50)	Алкогольный (n=20)	Смешанный (n=16)	<i>p</i>
Возраст, лет Me [25-75]	52[43-62]	49[40-58]	59[45-61]	0,2
min-max, лет	29-78	34 - 66	34-61	0,3
Длительность заболевания, лет Me [25-75]	6[3-10]	7[5-10]	5[3-7]	0,2

Примечание: *p* - значимость различий (*H*-критерий Краскела-Уоллиса)

Группа здоровых пациентов, состояла из лиц, участвующих в плановом профилактическом осмотре, и не имеющих патологии печени и других заболеваний, средний возраст – 47 лет (от 18 до 55 лет), из них 38 женщин и 32 мужчины.

2.2. Клинические методы обследования

Комплексное обследование и диагностика больных проводилось в соответствии с действующим стандартом и клиническими рекомендациями [25]. У всех больных был проведен опрос жалоб по всем функциональным системам организма. Были выделены основные симптомы, связанные с патологией печени и сопутствующих нарушений других органов и систем. К ним относились: желтуха, кожный зуд, боль, диспепсия (снижение аппетита, чувство тяжести, тошнота, метеоризм, жидкий стул, горечь во рту), кровоточивость (рвота с кровью, носовые кровотечения). Для больных характерна была тяжесть или боль в области печени после еды и при нагрузке. Была собрана информация о развитии заболевания: начало болезни, каковы были первые проявления, развитие заболевания (течение), проведенные диагностические исследования и лечение,

и его эффективность, последнее посещение врача или стационарная госпитализация.

Проведен распрос истории жизни: возраст, бытовые условия, трудоустройство, характер питания, семейное положение, наличие перенесённых инфекционных заболеваний, оперативных вмешательств, травм.

Всем пациентам проведено анкетирование на предмет установления хронического употребления алкоголя по опроснику CAGE (два и более утвердительных ответа расценивались как признак злоупотребления алкоголем), а также указание на регулярный прием алкоголя в токсических дозах: более 20 мл этанола в сутки для женщин и более 30 мл для мужчин в течение не менее 5 лет.

Опросник CAGE используется во всем мире для выявления хронической алкогольной зависимости [39] и содержит 4 вопроса:

1. Возникало ли у вас ощущение, что вам следует сократить употребление спиртных напитков?
2. Вызывало ли у вас раздражение, если кто-то из окружающих (друзья, родственники) говорили вам о необходимости сократить употребление спиртных напитков?
3. Испытывали ли вы чувство вины, связанное с употреблением спиртных напитков?
4. Возникало ли у вас желание принять спиртное, как только вы просыпались после употребления алкогольных напитков?

Для оценки стадии печеночной энцефалопатии применяли общедоступный классификатор Чайлд-Пью. 0-ая стадия – минимальные проявления печеночной энцефалопатии (состояние не изменено), 1-ая стадия – легкая (сонливость, нарушение внимания, поведение адекватное, заторможенность, легкий тремор рук, нарушение письма), 2-ая стадия – средняя (потеря ориентации, апа-

тия, неадекватное поведение, выраженный тремор, патология письма), 3-ая стадия – тяжелая (дезориентация, сонливость, спутанность сознания, агрессия, глубокая забывчивость, тяжелая деменция, повышение рефлексов, судороги), 4-ая стадия – кома (отсутствие сознания, нет реакции на боль, нет тонуса).

Проведено физикальное обследование пациентов, включающее оценку общего состояния больного, осмотр кожных покровов (окраска, наличие телеангиоэктазий, расчесы, пальмарная эритема, увеличение живота, отечность, наличие асцита). Оценивали признаки хронической алкогольной интоксикации: инъекция сосудов склер, двусторонний паротит, симптом «банкноты» (неопрятный внешний вид), тремор языка и пальцев, расширение капилляров на лице и области декольте, лабильность настроения, запах алкоголя изо рта [39]. Рассматривали адекватность поведения: спокойный, раздражительный, агрессивный, заторможенный. Проведено исследование АД, пульса, частота дыхания, рост, вес.

Пальпация печени выполнена по методу глубокой пальпации Образцова-Стражеско: больного укладывали на спину, ладонь правой руки помещали на выдохе под реберную дугу справа по срединно-ключичной линии. На вдохе печень выходит из-под края реберной дуги и становится доступна для пальпации. Оценивали край печени, болезненность, характер и консистенцию. Обращали внимание на метеоризм.

Выполнена перкуссия печени, определены координаты Курлова: по правой срединно-ключичной линии сверху вниз размер печени в норме составляет 9-11 см; по срединной линии – 7-9 см; по линии от верхнего края печени до левой границы по краю реберной дуги составляет 6-8 см. При постукивании по реберной дуге оценивали болезненность (симптом Ортнера).

2.3. Лабораторные и расчетные методы диагностики

Забор венозной крови у пациентов проводили при поступлении в стационар в одноразовые вакуумные пробирки фирмы Improvacuter. Во время забора

пациент находился в положении сидя, тяжелобольные - лежа. Венозная кровь отстаивалась при комнатной температуре (+15°C +20°C) до образования сгустка 30 мин, после чего образцы крови центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин для получения сыворотки.

Для гематологических исследований и выделения нуклеиновых кислот забор крови проводили в одноразовые пробирки с ЭДТА.

Для определения ПТИ использовали пробирки с цитратом натрия (3,8% цитрата) в соотношении крови 9:1. Образцы крови доставлялись в лабораторию не позднее 60 минут после забора крови.

Общеклинический анализ крови был выполнен на гематологическом анализаторе Medonic M20 (Boule Medical AB, Швеция) для определения количества тромбоцитов и эритроцитов и их характеристик.

Биохимическое исследование крови включало: определение общего и прямого билирубина проводили фотометрическим методом с диазореагентом (каталожный номер производителя набора № 8G62-20 и № 8G63-20); активность АЛТ и АСТ измеряли кинетическим методом с детекцией (№7 D81-20 и № 7D81-20); измерение активности ЩФ выполняли фотометрическим методом с пара-нитрофенилфосфатом (№ 7D55-21); измерение сывороточного уровня общего белка выполняли биуретовым методом (№ 7D73), измерение креатинина проводили кинетическим методом с пикриновой кислотой (№ 7D64-20), концентрацию альбумина определяли реакцией с бромкрезоловым зеленым с помощью набора «Альбумин-Ново» (ЗАО «Вектор-Бест» В - № 8025) на биохимическом анализаторе «Architect c4000» реагенты фирмы Abbott, США), согласно инструкции производителя. Определение С-реактивного белка проводили реакцией агглютинации латекса полуколичественным методом реагентами ЗАО «Эколаб» (Россия). Белковые фракции измеряли методом электрофореза на анализаторе УЭФ -01 «Астра» (Россия). Активность ГГТП определяли реагентами фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (№ В-8030) на биохимическом анализаторе

LW C200i (КНР). Уровень тимоловой пробы измеряли фотометрическим методом на приборе КФК-2 набором «Био-Лахема-тест» (Чехия), согласно инструкции производителя.

Лабораторные признаки (повышение АСТ над АЛТ, повышенные значения ГГТП, макроцитоз эритроцитов) использовали для подтверждения хронической алкогольной интоксикации [25].

Коагулологические тесты, с помощью которых также оценивали синтетическую функцию печени, включали: определение протромбинового времени по Квику, результат выражали в виде протромбинового индекса (ПТИ) и международного нормализованного отношения (МНО) на приборе Trombotimer-2 (Германия) наборами фирмы Технология-Стандарт (Россия) (кат. №607) .

Для верификации вирусной этиологии ЦП проводили определение маркеров вирусных гепатитов методом иммуноферментного анализа (ИФА). Выявление и подтверждение наличия в образцах сыворотки крови пациентов IgG и IgM к ВГС проводили с помощью наборов «Бест анти-ВГС» (комплект 2, № D-0772) производителя ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия).

Выявление вирусного ЦП в исходе гепатита В проводили с использованием наборов «HbsAg-ИФА-Бест» (№ D-0543) и «ВектоHВсAg-антитела» (№ D-0566) производителя ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). Для обнаружения суммарных антител к вирусу гепатита D (ВГD) в сыворотках больных с ЦП применяли набор «Вектогеп D – антитела» (№ D-0954) ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). Регистрацию результатов ИФА осуществляли на планшетном фотометре Stat-Fax-2100 (Awareness Technology Inc., США).

Для оценки тяжести использовали шкалу Чайлд–Пью (см. табл.2) по пяти клинико-лабораторным критериям: наличие асцита и энцефалопатии, уровень билирубина, альбумина и ПТИ [101]. По каждому критерию выставляли баллы

от 1 до 3, затем по сумме баллов определяли функциональный класс заболевания.

Для оценки наличия ЦП использовался расчетный индекс APRI (Aspartate-aminotransferase-to-Platelet Ratio Index) по формуле $APRI = (ACT / (\text{верхний предел АСТ})) \times 100 / \text{тромбоциты (10}^9/\text{л)}$ [114]. При значении индекса больше 1,0 - вероятность значительного фиброза и ЦП велика, если индекс меньше 0,5, то с большой вероятностью можно утверждать об отсутствии значимого фиброза и ЦП.

Таблица 2

Шкала Чайлд-Пью

Критерий	1	2	3
Асцит	нет	не рефрактерный	рефрактерный
Энцефалопатия	нет	лёгкая (I-II)	тяжёлая (III-IV)
Билирубин, мкмоль/л	менее 34	34-50	более 50
Альбумин, г/л	более 35	28-35	менее 28
ПТИ, %	более 60	40-60	менее 40

Примечание: класс А – 5–7 баллов, класс В – 8–10 баллов, класс С – 11 баллов

Для прогноза выживаемости использовали расчетную шкалу MELD (Model for End-Stage Liver Disease) по формуле $MELD = 11,2 \times \ln(\text{МНО}) + 9,57 \times \ln(\text{креатинин, мг/дл}) + 3,78 \times \ln(\text{билирубин, мг/дл}) + 6,43$ (табл.3).

Коэффициент перерасчёта для креатинина: $\text{мкмоль/л} \times 0,0113 = \text{мг/дл}$ и билирубина: $\text{мкмоль/л} \times 0,0585 = \text{мг/дл}$ [76,116].

Нижняя граница нормы для каждого показателя – 1, максимальное значение для уровня креатинина – 4 мг/дл; если пациент находится на гемодиализе,

то уровень креатинина принимается за «4». \ln — натуральный логарифм; Неблагоприятный жизненный прогноз ассоциирован со значением MELD > 18. Чем выше значение индекса, тем тяжелее протекает заболевание печени [116]

Уровень концентрации АФП определяли иммуноферментным методом набором ЗАО «Вектор-Бест» (№ Т-8456), г. Новосибирск на приборе Stat-Fax-2100 (Awareness Technology Inc., США). Диапазон измеряемых концентраций АФП 0–400 МЕ/мл, диапазон референтных значений 0–16 МЕ/мл, средняя концентрация 0,5 МЕ/мл.

Сывороточные концентрации цитокинов TNF- α , IL-4, IL-6, IL-1 β , IFN- γ , VEGF, G-CSF определяли с помощью иммуноферментного анализа на микропланшетном фотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) с использованием одноименных наборов цитокинов производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия).

Диапазон измеряемых концентраций VEGF составлял 0–2000 пг/мл. Диапазон референтных значений VEGF, указанных производителем реагента равнялся 10–246 пг/мл (средняя концентрация – 127 пг/мл). Диапазон измеряемых концентраций G-CSF составлял 0–500 пг/мл. Диапазон референтных значений G-CSF, указанных производителем реагента равнялся 0–40 пг/мл (средняя концентрация – 9 пг/мл) (табл. П.3).

Диапазон измерений TNF- α составлял 0–250 пг/мл. Диапазон референтных значений TNF- α , указанных производителем реагента равнялся 0–6 пг/мл (средняя концентрация – 0,5 пг/мл). Диапазон измерений IL-6 составлял 0–300 пг/мл. Диапазон референтных значений IL-6, указанных производителем реагента равнялся 0–10 пг/мл (средняя концентрация – 2 пг/мл). Диапазон измеряемых концентраций IL-1 β – 0–500 пг/мл. Диапазон референтных значений IL-1 β , указанных производителем реагента равнялся 0–11 пг/мл (средняя концентрация – 1,2 пг/мл). Диапазон измеряемых концентраций IL-4 составлял 0–100 пг/мл. Диапазон референтных значений IL-4, указанных производителем

реагента равнялся 0–4 пг/мл (средняя концентрация – 0,2 пг/мл). Диапазон измеряемых концентрации IFN- γ – 0-1000 пг/мл. Диапазон референсных значений 0–10 пг/мл (см. табл.П.2).

Метод определения цитокинов основан на твёрдофазном «сэндвич» – варианте ИФА с применением моноклональных антител двух видов с различной эпитопной специфичностью. Первое антитело иммобилизовано на микропланшете. Второе антитело конъюгировано с биотином. На первой стадии цитокин связывается с биотин-мечеными антителами. Во время второй инкубации антитела связывались с иммобилизованными маркёрами. Количество связавшегося конъюгата с моноклональными антителами формируют сэндвич-комплекс и его количество прямо пропорционально количеству цитокина в исследуемой пробе. После инкубации и промывки удаляли несвязавшуюся часть конъюгата и вносили субстрат пероксидазы хрена и хромогена-тетраметилбензидина. После заданной экспозиции измеряли ферментативную активность твёрдой фазы, которая пропорциональна количеству маркёра в пробе.

Методика проведения: кровь из локтевой вены забирали в одноразовые вакуумные пробирки и центрифугировали в течение 15 минут при 3 000 об/мин для отделения сыворотки. Образцы сразу замораживали и хранили 1 месяц в морозильной камере при температуре не выше минус 20 °С. Перед постановкой реакции исследуемые образцы были извлечены из холодильника и прогреты при температуре 18-25⁰С в течение 30 минут. Согласно инструкции были приготовлены разведения исследуемых образцов. После приготовления реагентов, стандартов и контролей по инструкции во все лунки вносили исследуемые образцы, перемешивали и инкубировали 2 часа. Затем лунки промывали промывочным буфером, затем добавляли по 100 мкл биотинилированного конъюгата и инкубировали под пленкой 1 час. После этого промывали повторно. Затем добавляли по 100 мкл конъюгата стрептавидин – пероксидазы и инкубировали

под пленкой 30 минут. Снова промывали и вносили хромогена во все лунки и инкубировали 25 минут в защищённом от света месте при комнатной температуре. В конце реакции во все лунки вносили стоп-реагента по 100 мкл. Результат выражается в пг/мл. Общее время проведения реакции 4 часа.

Для уточнения вирусной этиологии использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). Для выявления нуклеиновых кислот ВГВ, ВГС и ВГД использовали наборы «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» (комплект 2, кат.№ С-8880), «РеалБест ВГС ПЦР» (комплект 2, № D-0795), «РеалБест ВГВ ПЦР» (комплект 2, № D-0596)», «РеалБест ВГД ПЦР» (комплект 2, D-0997) производителя ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия) на приборе «CFX-96» («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США).

Определение однонуклеотидного полиморфизма (SNP) генов фактора роста эндотелия сосудов *VEGFA* в позиции G-634C (rs 2010963) (№ NP-453-100), интерлейкина-6 *IL-6* в позиции G-174C (rs 1800795) (№ NP-512-100) и *TNF* в позициях G4682A (rs 1800629) (№ NP-465-100) проводили методом ПЦР в режиме реального времени наборами "SNP-Скрин" ЗАО «Синтол» (г. Москва). Амплификацию выполняли на приборе «CFX-96» Bio-Rad Laboratories, Inc. (США).

Выделение ДНК проводили из венозной крови, предварительно стабилизированной калиевой солью этилендиамин-тетраацетата (ЭДТА), по протоколу выделения, приложенного к коммерческому набору «ДНК-Экстран-1» (№ EX-50). Лизирующие растворы, входящие в набор, предварительно тщательно перемешивали. Затем лизирующие растворы смешивали с 300 мкл крови. К лизату добавляли осаждающий раствор №1, затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 2 минут и вновь добавляли осаждающий раствор №2. Затем перемешивали до появления осадка ДНК. Вновь центрифугировали при 13000 об/мин и удаляли надосадочную жидкость. Затем добавляли 400 мл промывоч-

ного раствора и несколько раз перемешивали, промывая ДНК. После чего центрифугировали 2 минуты 13000 об/мин, высушивали и добавляли 100 мкл элюирующего раствора (реагент для растворения ДНК). Осадок прогревали до 65 °С 5 мин.

Концентрация ДНК, определенная на спектрофотометре (BioRad, США) составляла от 10 до 20 мг из 300 мкл крови. Далее реактивы (2,5× реакционной смеси, 2,5× разбавителя и Taq-полимеразы) смешивали в равном объеме непосредственно перед проведением исследования. Затем в промаркированные ПЦР-пробирки вносили по 20 мкл смеси компонентов и по 5 мкл контрольных и исследуемых образцов. Рабочий объем реакции составлял 25 мкл. Затем поместив микропланшет в блок, в соответствии с протоколом исследования, проводили амплификацию на термоциклере "CFX96" (BioRad, США).

Регистрацию сигнала флуоресценции проводили после стадии отжига праймеров для выбранных генов по двум каналам флуоресценции: FAM (карбоксифлуоресцеин) и HEX (6-карбоксихексахлорфлуоресцеин).

Результаты интерпретировались с использованием метода аллельной дискриминации в зависимости от характера кривых амплификации с помощью встроенного пакета программного обеспечения прибора (см. рис. П.3.1,2).

Различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливали по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров (табл. П. 3.4).

В случае «разгорания» канала Allele 1 (FAM) свидетельствовало о наличии гомозиготы, Allele 2 (HEX) — наличие минорной гомозиготы, наличие «разгорания» в двух каналах свидетельствовало о гетерозиготном носительстве (пример табл. П.3.5).

2.4. Инструментальные методы исследования

Пациентам было выполнено УЗИ органов брюшной полости для оценки структуры и размеров печени, селезенки, портальных сосудов на стационарном аппарате LOGIQ S8 (США). Оценивали размеры печени и селезенки (как правило увеличение), контур печени (становится неровный, бугристый), изменение структуры паренхимы печени (ее неоднородность), эхогенность органа (как правило повышено), звукопроводность (повышено), наличие и размер очагов (паренхиматозные очаги фиброза), диаметр вен портальной системы (более 14 мм, изменение и деформация сосудистого рисунка, расценивали как критерий ЦП), наличие коллатералей и свободной жидкости [31]. Более половины больных выполнено рентгенологическое исследование ЖКТ с контрастным веществом на предмет исследования желудка и наличия кровотечений варикозного расширенных вен пищевода, компьютерная томография брюшной полости и забрюшинного пространства с контрастированием, фиброэзогастроскопия пищевода и желудка.

2.5. Методика статистического анализа результатов

Полученные данные были обработаны с использованием методов непараметрического анализа. Систематизация и визуализация полученных данных выполнена в программе «Microsoft Office Excel 2016». Статистическая обработка осуществлена с помощью программы «STATISTICA 10.0», а также с использованием авторского пакета прикладных электронных таблиц «Stat-2000» (В.С. Шелудько, 2001).

Расчет выборки проводили на стадии планирования исследования с заданной мощностью 80%, учитывая параметры для независимых критериев при наличии заданных наблюдений по каждой категории пациентов. При известной

генеральной совокупности (по данным ГКУЗ ПК «МИАЦ» по Пермскому краю зарегистрировано 2717 человек с ЦП).

Для проверки нормальности распределения данных применялся критерий Шапиро-Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерий Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых более 50). Если вероятность ошибки критерия была статистически значима, то нулевая гипотеза о нормальности распределения отвергалась.

Данные описывали в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й и 75-й %), обозначаемых как Me (25; 75). Номинальные данные описывали с указанием процентных долей.

Оценку статистической значимости различий в двух независимых выборках использовали ранговый U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney), при сравнительном анализе трех групп применяли H-критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis) и медианный тест. При сравнении критического значения (менее 0,05) статистическая значимость различий признавалась достоверной.

Для исследования зависимостей использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s , при распределении значений измеряемых величин, отличающемся закона от нормального распределения). Для значимости оценки корреляции использовали следующие критерии: коэффициент был более 0,7, делался вывод о высокой корреляции; значение r от 0,3 до 0,7 – как умеренная корреляция, а значения r менее 0,3 – как слабая. Различия и показатели корреляции считались статистически значимыми при $p < 0,05$ по Z-критерию.

Сравнение номинальных данных проводили при помощи χ^2 Пирсона, оценивая значимость различий между фактическим количеством и качественными характеристиками выборки, попадающих в каждую категорию. Вначале рассчитывалось ожидаемое количество наблюдений в каждой из ячеек таблицы сопряженности. Количественные признаки преобразовывались в качественные

по принципу: значения меньше 1-й квартили обозначаются 1, от 1-й до 3-й квартили - 2, больше 3-й квартили - 3. Затем рассчитывали значения критерия χ^2 . При $p < 0,05$ зависимость статистически достоверна при $P = 95\%$. Значение K_i (коэффициент информативности, скорректированный коэффициент Пирсона, аналог коэффициента корреляции для количественных признаков). Если он меньше 0,3 - зависимость очень слабая (практически нет), если от 0,3 до 0,7 - умеренная, если больше 0,7 – выраженная [57].

Анализ данных по генотипированию проводили с использованием унифицированной программы «Ген-Эксперт» (http://gen-exp.ru/calculator_or.php). Данная программа служит для расчета статистических параметров ассоциаций «ген-фактор» или «ген-ответ», использующих SNP (однонуклеотидные полиморфизмы). Имеющиеся данные типа «случай — контроль» относились к качественным, выборки были независимы. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди—Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 Пирсона. Обработку результатов генетического исследования осуществляли с использованием критерия отношения шансов (ОШ) с расчетом для него 95%-го доверительного интервала. Для различных моделей наследования: общей и мультипликативной модели наследования значения считались достоверными при $p < 0,05$.

Диагностическую ценность показателей оценивали путём вычисления диагностической чувствительности, специфичности и ROC-кривой по методике В.В.Власова [15]. Для проведения ROC-анализа использовали программное обеспечение Med Calc Software ver. 14.12. Оценку графических моделей проводили по экспертной шкале значений площади под ROC-кривой (Area Under Curve – AUC), которая позволяет выделить отличное (0,9-1,0), очень хорошее (0,8-0,9), хорошее (0,7-0,8), среднее и неудовлетворительное качество модели ниже 0,6. Чем выше показатель площади графического изображения AUC, тем

большей прогностической силой обладает модель. Диагностическую чувствительность теста оценивали, как процент правильно определённых случаев к количеству всех больных с ЦП. Диагностическую специфичность теста рассчитывали, как отношение истинно отрицательных случаев к здоровым лицам (табл.П.4.6).

Для определения оптимального порогового значения использовали Индекс Юдена (J), как показатель оценивающий чувствительность и специфичность всех возможных пороговых значений, который рассчитывали по формуле (формула П.4.1) [118]. Индекс Юдена указывает на высокую точность теста при значениях близких к единице.

Оценку развития ситуации оценивали по четырехпольной таблице с расчетом специфичности и чувствительности более 75% [15].

Глава 3. КЛИНИКО – ЛАБОРАТОРНЫЕ СИНДРОМЫ У БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ И КЛАССОМ ТЯЖЕСТИ ЦИРРОЗОВ ПЕЧЕНИ

3.1. Клинические проявления ЦП при различных этиологических вариантах

Клиническая характеристика больных ЦП вирусной этиологии. При осмотре клинического статуса у 90% больных вирусным ЦП выявлены признаки астенического синдрома. Все пациенты предъявляли жалобы на слабость, утомляемость, раздражительность, снижение трудоспособности (рис. 3).

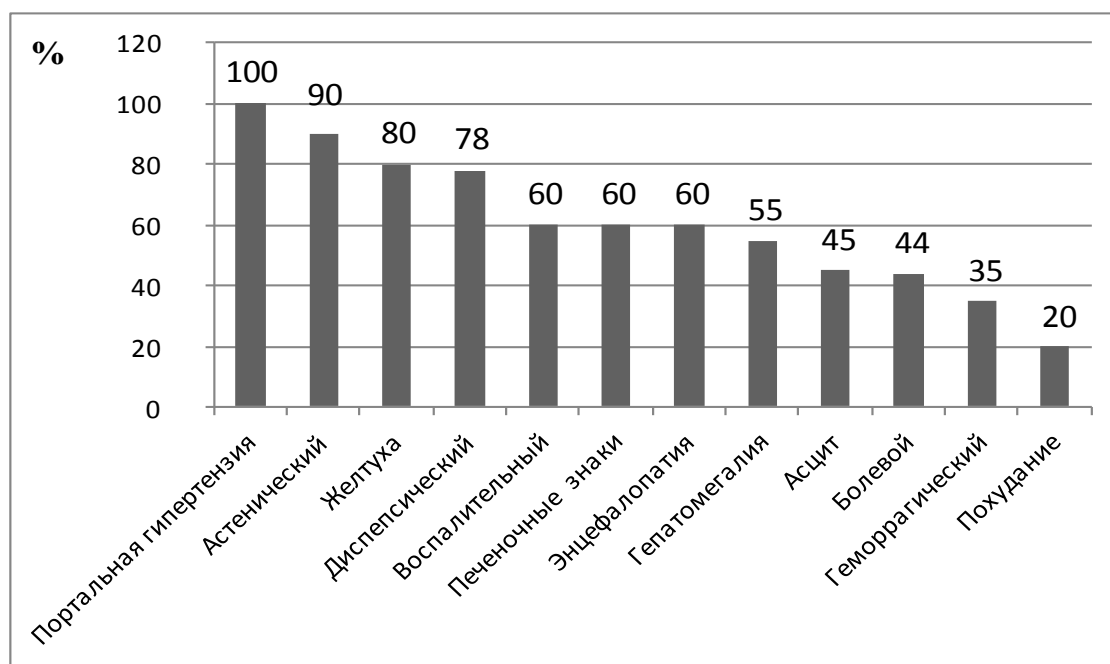


Рис. 3. Частота выявляемости клинических синдромов в группе больных вирусным ЦП.

Диспепсические явления, как снижение аппетита, вздутие живота, неустойчивый стул, тошноту, периодическую рвоту. В 50% случаев отмечалась

тяжесть в правом подреберье, артралгии, субфебрилитет, носовые геморрагии, отеки на ногах. Больше половины пациентов отмечали снижение веса, зуд кожных покровов. У 80% больных так же отмечена желтуха различной степени интенсивности.

При объективном осмотре у 55% больных данной группы было зарегистрировано увеличение и уплотнение печени разной степени выраженности, в 60% случаев выявлено увеличение селезенки. У большинства пациентов отмечены печеночные «знаки» в виде телеангиоэктазий.

По данным УЗИ обследования у всех больных наблюдались клинические проявления портальной гипертензии в виде накопления жидкости, изменения паренхимы печени, расширения венозных коллатералей на передней брюшной стенке выявлены у 80% обследованных.

Клиническая характеристика больных ЦП алкогольной этиологии. При анализе клинического статуса у 80% больных алкогольным циррозом печени (АЦП) отмечались: общая слабость, быстрая утомляемость, снижение работоспособности, нарушения сна, раздражительность, депрессия, повышение температуры (рис.4).

Больные предъявляли жалобы на ноющие постоянные боли в правом подреберье, усиливающие после приема пищи, не переносимость жирной пищи, учащение сердцебиения, увеличение живота, одышку, тошноту. Пациенты отмечали окрашивание кала в красный цвет (30%).

При объективном осмотре у пациентов отмечалось сухость кожи, с желтоватым оттенком, отёчность, болезненность при пальпации живота, ослабленный тонус мышц, заторможенность в сознании. На теле имелись «печеночные» знаки.

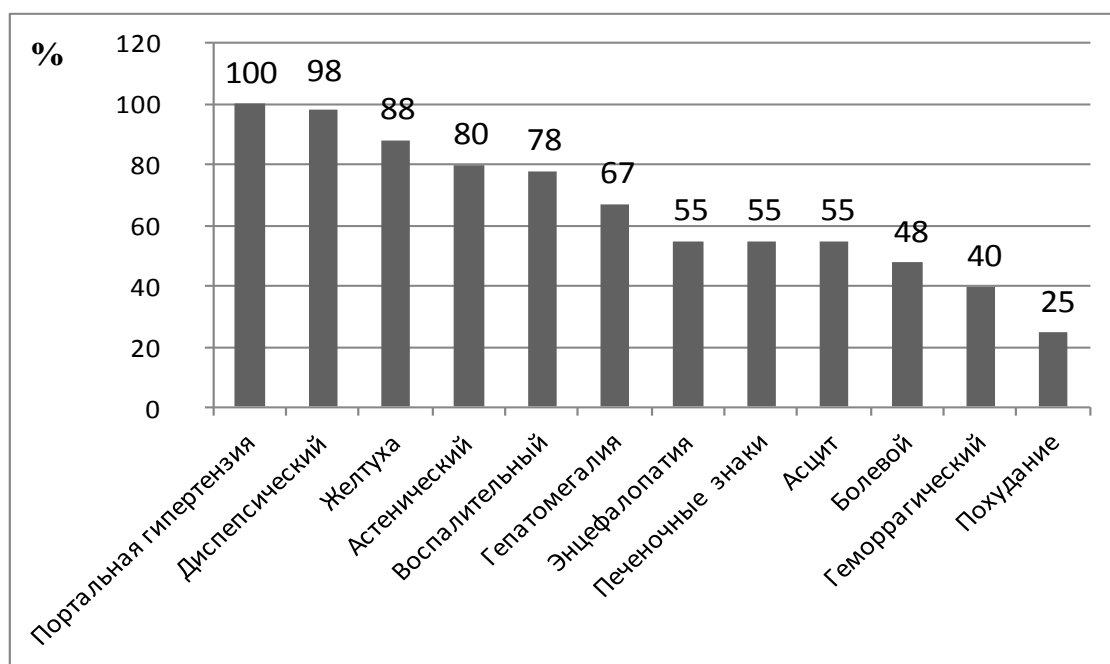


Рис. 4. Частота встречаемости клинических синдромов в группе алкогольным ЦП.

По данным УЗИ выявлены выраженные признаки портальной гипертензии, расширение вен передней брюшной стенки в виде «головой медузы», спленомегалия и расширение диаметра печёночных вен.

Алкогольный генез ЦП подтверждался на основании клинико-амнестических данных (частый и длительный приём алкоголя более 50 мг в сутки на протяжении более 10 лет).

Для оценки хронической алкогольной интоксикации все участники исследования заполняли опросник «CAGE». Рассматривали положительные ответы на три и четыре вопроса. При заполнении опросника CAGE 75% пациента на два вопроса, 20% пациента дали с АЦП три положительных ответа и 5% утвердительно ответили на все четыре вопроса.

При визуальном осмотре пациентов с алкогольным ЦП отмечали признаки употребления алкоголя: неопрятный внешний вид (ссадины, синяки на теле),

тремор языка и пальцев, расширение капилляров на лице и области декольте, лабильность настроения, запах алкоголя изо рта. По результатам лабораторных тестов выявлено повышение АСТ над АЛТ, повышенные значения ГГТП и макроцитоз эритроцитов [39]. Отсутствие серологических маркёров вирусных гепатитов.

По данным инструментальных методов диагностики (ультразвукового исследования, компьютерной томографии) у пациентов с АЦП наблюдались диффузные изменения с усилением фиброзного компонента в печени, изменение контуров печени, увеличение печени и селезёнки, наличие свободной жидкости (от 1 литра и более), неоднородное понижение плотности печени, тромбоз воротной вены и коллатералей, признаки портальной гипертензии.

Клиническая характеристика больных ЦП смешанной этиологии.

Длительность заболевания при смешанном циррозе печени около 5 лет. При анализе клинического статуса у 100% больных ЦП смешанного генеза отмечались жалобы астенического и диспепсического характера (рис.5). В анамнезе звучало периодическое употребление алкоголя. Больные жаловались на нарушение сна, быструю утомляемость, раздражительность. При осмотре выявлены геморрагический синдром, выраженность желтушности разной степени, наличие печеночной энцефалопатии.

При обследовании отмечалось: болезненность при пальпации живота в правом подреберье и эпигастрии, спленомегалия, желтушность, эритемы, «печеночные» знаки. По лабораторным данным получены положительные серологические тесты на подтверждение вирусного гепатита.

При заполнении опросника GAGE 45% пациентов со смешанным ЦП дали два положительных ответа, 55% - три положительных ответа и 10% утвердительно ответили на все четыре вопроса. Согласно критериям оценки анкеты, утвердительный результат хронического употребления алкоголя считается от двух положительных ответов и более, что и позволяет отнести наших пациен-

тов в группы с АЦП и смешанным генезом.

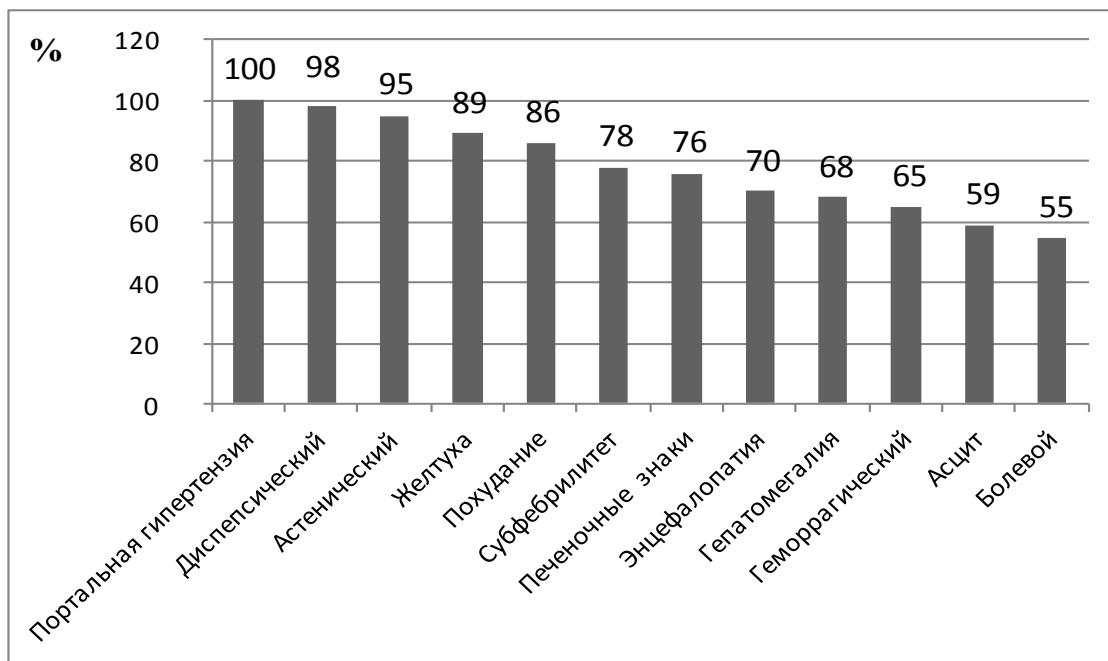


Рис. 5. Частота выявляемости клинических синдромов в группе смешанным ЦП.

В ходе нашего исследования были проанализирована частота встречаемости основных клинических синдромов у пациентов с различными циррозами (табл.3). У большинства пациентов (80-100%) отмечались симптомы: астеновегетативный, диспепсический, воспалительный, желтушный и портальной гипертензии. Несколько повышенная частота выявляемой воспалительной реакции и диспепсического синдрома отмечена при алкогольном ЦП. При ЦП смешанного генеза доля патологических клинических проявлений была несколько выше по сравнению с другими ЦП, что еще раз подтверждает пагубное сочетанное воздействие алкоголя и гепатотоксичности вирусной инфекции. Болевой синдром отмечен только у половины больных и сопоставим во всех группах. Похудание, также не всегда регистрировалось у пациентов. Для вирусного и смешанного цирроза более часто выявлена печеночная энцефалопатия (до 76%) по сравнению с алкогольным циррозом (до 55%). Тем не менее, достовер-

ности различий в клинических проявлениях при ЦП разной этиологии выявлено не было.

Таблица 3

Частота встречаемости 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 синдром	44	48	55	0,5
Воспалительный	60	78	78	0,3
Гипотрофический синдром	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

Примечание: *p* – значимость различий.

У половины больных «печеночные» знаки, кровотечения носовые, увеличение живота, асцит, как видно из таблицы, не регистрировались, что еще раз подтверждает субъективность клинических критериев, зависящих от многих факторов.

При анализе зависимости между основными клиническими симптомами у больных с ЦП и лабораторными тестами нами выявлены следующие закономерности (табл.4).

Таблица 4

Зависимость между основными клиническими симптомами у больных с ЦП и лабораторными тестами

Клинические симптомы/лабораторные тесты	<i>Ki</i>	<i>p</i>
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

Пр и м е ч а н и е: *Ki* - коэффициент информативности; *p* – значимость зависимости.

Шкала MELD включает следующие лабораторные показатели: креатинин, билирубин, МНО и натрий в сыворотке крови и используется как калькулятор выживаемости больных ЦП. Максимально выраженная зависимость в наших исследованиях выявлена между шкалой MELD и иктеричностью/субиктеричностью кожных покровов и склер ($Ki=0,849$, $p=0,004$). Отеки нижних конечностей и даже пастозность голеней также демонстрировали выраженную зависимость с показателем MELD ($p =0,027$ и $p=0,036$). Высокая вза-

имосвязь была и между таким признаком как энцефалопатии и $\text{IL-1}\beta$ ($Ki=0,78$, $p=0,01$).

Интерлейкин-6 продемонстрировал умеренные взаимосвязи с заторможенностью и гепатоцеллюлярной недостаточностью ($Ki=0,673$ и $Ki=0,607$ соответственно) (см. рис.6).

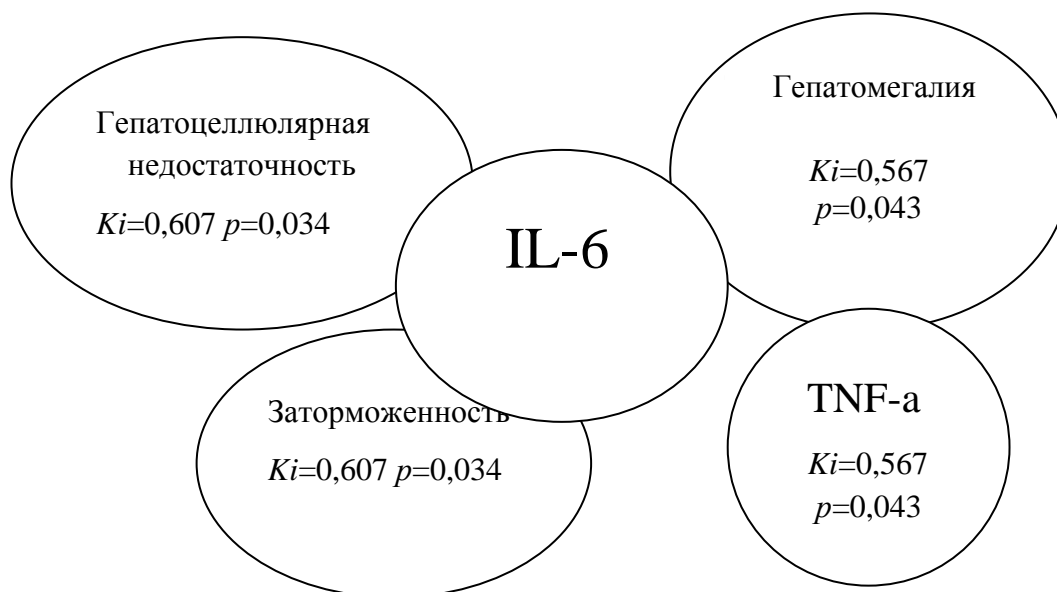


Рис.6. Зависимость клинических проявлений и уровня воспалительных цитокинов.

В синдром гепатоцеллюлярной недостаточности входят различные нарушения синтетической функции печени, в том числе снижение уровня альбумина, факторов протромбинового комплекса, снижение дезинтоксикационной функции, что на начальных этапах проявляется астеноневротическим синдромом в виде слабости, утомляемости, плаксивости, раздражительности, даже если это еще не приводит к явным клиническим проявлениям – отечному, геморрагическому синдромам, и печеночной энцефалопатии вплоть до гепатаргии.

Таким образом, IL-6 может отражать даже незначительное нарушения синтетической и дезинтоксикационной функций печени и таким образом объективизировать клинические симптомы у больных ЦП, особенно базирующиеся на субъективном отражении жалоб больного.

Провоспалительные маркеры IL-6 наряду с TNF-а, как объективные лабораторные тесты в процессе исследования продемонстрировали логичную достоверную зависимость с гепатомегалией, что подтверждает наличие активного воспаления при ЦП и прогрессирование заболевания.

В целом повышение выработки исследованных цитокинов демонстрирует их патогенетическую значимость в тяжести поражения и прогрессирования при ЦП.

Клиническая характеристика больных ЦП по классам тяжести заболевания.

По шкале Чайлд-Пью 25 (что составляет 29%) больных находились на класса тяжести А, 29 (32%) пациентов были в классе тяжести В и у 32 (39%) больных наблюдался класс С (рис.7).

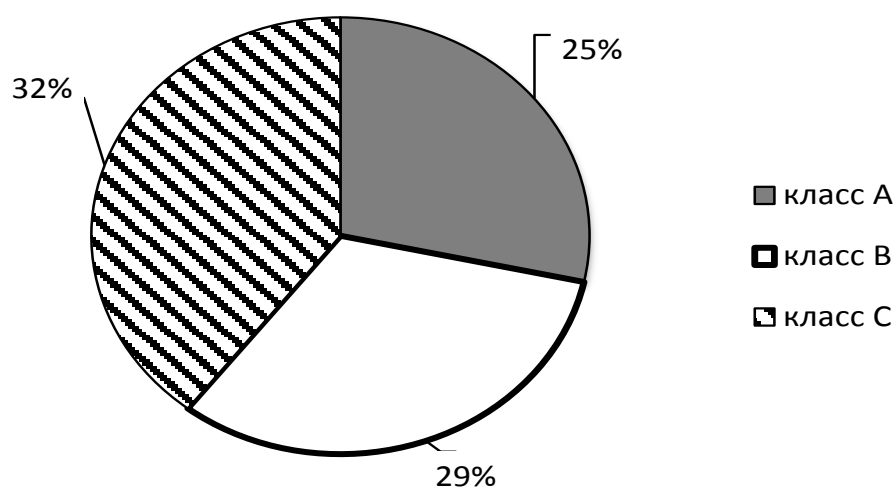


Рис. 7. Распределение пациентов с ЦП по функциональным классам шкалы Чайлд-Пью.

На ранних стадиях отмечали больше общие неспецифические симптомы, незначительные изменения со стороны пищеварительной системы. В стадии выраженных клинических проявлений выше перечисленные проявления нарастали. Болевой синдром усиливался, носил более постоянный характер, особен-

но после физической нагрузки и приема пищи. Проявление дискомфорта носили более выраженный характер (см.табл.5).

Таблица 5

Частота встречаемости клинических проявлений по классам тяжести ЦП

Клинические синдромы (%)	Класс А (n=25)	Класс В (n=29)	Класс С (n=32)	<i>p</i>
Астеновегетативный	80	90	100	0,8
Диспепсический	60	80	100	0,2
Болевой	40	68	77	0,05
Гипотрофический синдром	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

Примечание: *p* – значимость различий.

Отмечалась рвота с примесью крови. Гипотрофический синдром: больные отмечали похудание, слабость. Геморрагический синдром: от редкого носового кровотечения до появления «синячков» на коже. Желтушный синдром: кожный зуд, желтуха различной интенсивности. Признаки энцефалопатии: нарушение памяти, заторможенность, поведенческие нарушения. Отечно-асцитический синдром: асцит, отеки. При осмотре у всех больных отмечается увеличение печени и селезенки, «печеночные» знаки («пальмарная» эритема, гинекомастия, сосудистые звездочки), петехиальные геморрагии, отеки на ногах. Мезенхимально-воспалительный синдром: повышенная температура тела.

При анализе лабораторных тестов отмечается синдром цитолиза, холестаза, клеточно-печеночной недостаточности, гепаторенальный синдром. Вторичная панцитопения умеренной степени тяжести. В стадии декомпенсации отмечалось резкое похудание, до кахексии, выраженная энцефалопатия, асцит, желудочно-кишечные кровотечения, варикозное расширение вен пищевода и желудка, геморрагическая сыпь, «печеночные» знаки, энцефалопатия. Выраженность клинических признаков осложнений: холецистит, панкреатит, сердечные изменения, гепаторенальный синдром, полиогранная недостаточность. В терминальной стадии зарегистрировано двое больных. Отмечено резкое похудание, атрофия мышц конечностей, анасарка. Отмечали выраженные проявления синдромов: портальная гипертензия, гиперспленизм, гепаторенальный синдром.

У всех больных при инструментальных методах обследования (УЗИ) имеются диффузные изменения паренхимы печени с признаками портальной гипертензии, гепатоспленомегалия, расширение вен портальной системы.

Проведено исследование взаимосвязи класса тяжести ЦП с клиническими проявлениями. Выявлена сильная ассоциативная связь между функциональным классом тяжести заболевания и клиническими признаками (табл. 6).

Таблица 6

Взаимосвязь класса тяжести и основных клинических признаков при ЦП

Показатели	<i>Ki</i>	<i>p</i>
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

Продолжение табл.6

Класс тяжести и цитопения	0,78	<0,001
Класс тяжести и печеночная энцефалопатия	0,76	<0,001

Примечание: K_i - коэффициент информативности; p – достоверность зависимости

Таким образом, клинические симптомы при ЦП встречаются с различной частотой и степени выраженности, и имеют сильную корреляцию с классом тяжести заболевания.

3.2. Лабораторные тесты у больных циррозами печени

Функциональные лабораторные печеночные пробы. По лабораторным биохимическим исследованиям у пациентов с ЦП выявлены нарушения функциональных печеночных тестов (табл.7).

Таблица 7

Особенности биохимических показателей больных ЦП и в группе контроля,
Me (25-75%)

Показатель	Группа контроля (n=29)	ЦП (n=86)	p
АЛТ, Ед/л	16,9 (14-18,6)	44 (28-66,7)	0,02
АСТ, Ед/л	19 (17,6-27,5)	66 (47-107)	0,006
ГГТП, Ед/л	10,9 (9,9-15,6)	64,5 (23,6-152,8)	0,02
Билирубин общ, мкмоль/л	10,0 (8,25-14,53)	40,0 (21-136)	0,01
Билирубин пр., мкмоль/л	3,0 (2,2-3,5)	25,25 (11,9-50,9)	0,008
ЩФ, Е/л	56 (47-72)	92 (64-182)	0,01
Тимоловая проба, Ед S-H	2,0 (2-3)	6,14 (4,4-10,6)	<0,001
Общий белок, г/л	73 (70-78)	70 (63-79)	0,2
Альбумин, г/л	50,2 (45,2-51)	34,7(28-40,9)	<0,001
Альбумин, %	52,95 (50,09-57,6)	41,77 (37,05-49)	<0,001
α -1-глобулины, %	3,75(3,39-3,86)	3,95(3,38-4,7)	0,2
α -2- глобулины, %	8,9 (8,54-9,8)	9,16 (8,17-10,25)	0,6
β -глобулины, %	13,6 (13,1-14,7)	13,4 (11,4-16,6)	0,8

Продолжение табл.7

γ-глобулины, %	19,95 (17,7-20,7)	30,1 (22,5-35,6)	<0,001
СРБ, мг/л	0,1(0-0,2)	10(0-24)	<0,001
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	262(223-297)	127(83-160)	<0,001
ПТИ,%	100(93-100)	80(73-93)	<0,001
АФП, МЕ/мл	1,25(1,08-1,45)	3,05(2,1-5,02)	<0,001

Примечание: p – значимость различий по U-критерию Манна-Уитни.

В группе обследованных зафиксировано достоверное повышение трансаминаз АЛТ и АСТ в 3 раза в сравнении с группой практически здоровых лиц ($p=0,02$ и $p=0,006$, соответственно по критерию Манна-Уитни). Значимое повышение активности в 6 раз ГГТП ($p=0,02$), сопровождающее холестаза и цитоллиз гепатоцитов, в сочетании с гипербилирубинемией за счет конъюгированного билирубина ($p=0,008$) и увеличение активности ЩФ ($p=0,01$) подтверждает наличие холестатического синдрома у больных ЦП.

Достоверное повышение тимоловой пробы у пациентов с ЦП в сравнении с группой контроля ($p<0,001$), СРБ ($p=0,001$), снижение уровня альбумина ($p<0,001$) и повышение фракции γ-глобулинов ($p=0,001$) свидетельствует о нарушении биосинтетической функции печени и подтверждает воспалительный синдром. Достоверно значимое снижение количества тромбоцитов ($p<0,001$) и ПТИ ($p<0,001$) указывает на нарушение свёртывающей системы крови.

Регистрировалось повышение сывороточной концентрации АФП в 3 раза в сравнении с группой контроля ($p<0,001$), что указывает на активацию патологической регенерации в печени (рис.8)



Рис. 8. Уровень АФП в группах больных ЦП и здоровых

При корреляционном анализе АФП с ферментами и билирубином найдены прямые взаимосвязи в группе больных ЦП, что подтверждает патогенетических связей данных показателей при поражении печеночной ткани (табл.8).

Таблица 8

Взаимосвязи АФП с показателями цитолиза и холестаза
в группе больных ЦП

Показатели	<i>rs</i>	<i>p</i>
АФП и АЛТ	0,33	0,003
АФП и АСТ	0,25	0,03
АФП и билирубин общ.	0,21	0,04

Примечание: *rs* – коэффициент корреляции; *p* - значимость корреляции.

Воспалительный тест СРБ показал достоверную значимость при корреляционном анализе с глобулиновыми тестами и билирубином (табл.9).

Таблица 9

Взаимосвязи СРБ с показателями холестаза
и глобулиновыми фракциями в группе больных ЦП

Показатели	<i>rs</i>	<i>p</i>
СРБ и билирубин общий	0,24	0,04
СРБ и билирубин пр.	0,27	0,04
СРБ и α -1-глобулин	0,38	0,01
СРБ и α -2-глобулин	0,25	0,04

Примечание: *rs* – коэффициент корреляции; *p* - значимость корреляции.

То есть воспаление усугубляет нарушение функциональных тестов печени.

Таким образом, лабораторное исследование подтвердило наличие у пациентов с ЦП изменения функциональных печеночных тестов, подтверждающих

наличие лабораторных синдромов цитолиза, холестаза, воспаления, печеночно-клеточной недостаточности и повышенной регенерации гепатоцитов.

При сравнении лабораторных показателей (табл.10) в группе мужчин были отмечены статистически значимые повышенные уровни прямого билирубина ($p=0,02$) и значения тимоловой пробы ($p=0,04$) в сравнении с женщинами, что свидетельствуют о взаимосвязи уровня холестаза и диспротеинемии мужским полом.

Таблица 10

Гендерные особенности пациентов ЦП по лабораторным тестам,
Me (25-75%)

Показатель	Мужчины ЦП (n=44)	Женщины ЦП (n=42)	<i>p</i>
АЛТ, Ед/л	48,1(38-87)	41(25-56,4)	0,07
АСТ, Ед/л	69(52-95)	61(36-121)	0,2
ГГТП, Ед/л	64,5 (24,3-143,4)	63,25(23-169,9)	0,85
Билирубин общ, мкмоль/л	63(24-152)	32,9(19,4-99)	0,18
Билирубин пр., мкмоль/л	29,6 (13,5-68,9)	17,6 (10,45-33,9)	0,02
ЩФ, Е/л	112(66-204)	91(49-149)	0,14
Тимоловая проба, Ед S-H	7,8(5-14,3)	5,7(4,4-9)	0,04
Общий белок, г/л	71,5(62,5-79)	69,7(64-78)	0,62
Альбумин, г/л	31,2(27,5-40,6)	36,1(30,8-41,7)	0,09
Альбумин,%	39,05(34,6-48,2)	44,62(39,4-49)	0,1
α -1-глобулины,%	3,98(3,22-4,7)	3,92(3,66-4,7)	0,47
α -2глобулины,%	9,54(8,39-10,17)	8,84(8,17-10,5)	0,95
β -глобулины,%	12,83(10,9-16,52)	13,84(12,42-16,64)	0,22

Продолжение табл.10

γ-глобулины, %	33,08(24,9-37,1)	26,19(22,5-34,4)	0,07
СРБ, мг/л	12(0-24)	1,5(0-12)	0,11
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	133(90-160)	113(83-159)	0,8
ПТИ, %	79(75-85)	79(60-93)	0,2
АФП, МЕ/мл	3,04(1,58-27,4)	3,59(1,2-13)	0,55

Примечание: p – значимость различий U-критерий Манна-Уитни.

Цитокиновый профиль при циррозах печени. 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 ($p=0,01$) (табл. 11). Сравнительный анализ уровня цитокинов IL-1β, IL-4 и IFN-γ у пациентов ЦП со здоровыми пациентами показал сопоставимые результаты. Однако эпизодическое повышение их концентрации было зарегистрировано у отдельных больных ЦП.

Таблица 11

Уровень цитокинов у больных ЦП и в группе контроля, Ме (25-75%)

Показатель	Группа контроля (n=29)	Группы больных ЦП (n=86)	p
TNF-α, пг/мл	0,5(0,1-1,1)	3,5(2,6-4,7)	0,0001
IL-1β, пг/мл	3,15(3-3,3)	2,7(2,4-3,1)	0,7
IL-4, пг/мл	1,4(1,2-1,7)	1,6(1,4-1,9)	0,15
IL-6, пг/мл	0,6(0,2-2,3)	22(8,3-47,5)	0,0001
IFN- γ, пг/мл	9,45(9-9,8)	9,7(2,4-3,1)	0,13
VEGF, пг/мл	86,65 (6,6-187,4)	203,6 (93,85-478,75)	0,014
G-CSF, пг/мл	8,3(6,2-14,3)	10,85(5-57,1)	0,03

Примечание. p – значимость различий по критерию Манна-Уитни

При сравнении сывороточных уровней цитокинов в группах мужчин с ЦП уровень G-CSF был выше в 2,5 раза, чем у женщин с ЦП ($p=0,03$) (табл.12).

Таблица 12

Гендерные различия в группе с ЦП по уровню цитокинов, Ме (25-75%)

Показатель	Мужчины ЦП (n=44)	Женщины ЦП (n=42)	<i>p</i>
TNF- α , пг/мл	3,6 (2,7-5,4)	3,25 (2,1-4,3)	0,2
IL-1 β , пг/мл	2,9 (2,5-3,2)	2,6 (2,3-2,9)	0,08
IL-4, пг/мл	1,7 (1,45-1,9)	1,6 (1,2-1,9)	0,6
IL-6, пг/мл	23,9 (8,3-50,7)	18,2 (7,5-40,7)	0,33
IFN- γ , пг/мл	9,85 (9,1-10,5)	9,6 (9,1-10)	0,45
VEGF, пг/мл	232 (111,6-531)	169,4(83,2-324,8)	0,33
G-CSF, пг/мл	19,6 (5,35-64,1)	7,75(4,85-15,5)	0,03

Примечание: *p* – значимость различий по критерию U-критерий Манна-Уитни.

В остальных случаях достоверно значимых результатов уровней цитокинов получено не было.

В группе больных с ЦП выявлены статистически значимые корреляции уровней цитокинов со всеми значимыми лабораторными показателями, а также взаимосвязь IL-6 и VEGF с индексом APRI (табл.13).

Таблица 13

Взаимосвязи цитокинов с биохимическими показателями больных циррозами

Показатель	<i>rs</i>	<i>p</i>
TNF- α и СРБ	0,26	0,04
TNF- α и альбумин	-0,24	0,03
TNF- α и IL-6	0,50	<0,001
TNF- α и IL-1 β	0,31	0,02
TNF- α и IFN- γ	0,26	0,03
IL-6 и индекс APRI	0,48	<0,001
IL-6 и СРБ	0,55	<0,001

Продолжение табл.13

IL-6 и АСТ	0,23	0,04
IL-6 и билирубин пр.	0,39	0,001
IL-6 и ГГТП	0,29	0,01
IL-6 и ЩФ	0,38	0,001
IL-6 и альбумин	-0,58	<0,001
IL-6 и γ -глобулин	0,29	0,03
IL -6 и VEGF	0,36	0,003
VEGF и индекс APRI	0,35	0,01
VEGF и АСТ	0,23	0,04
VEGF и СРБ	0,58	<0,001
VEGF и билирубин пр.	0,22	0,04
VEGF и альбумин	-0,25	0,04
G-CSF и СРБ	0,29	0,03

Пр и м е ч а н и е: rs – коэффициент корреляции; p - значимость корреляции.

При этом IL-6 демонстрировал прямую взаимосвязь с СРБ и обратную корреляцию с концентрацией альбумина, что объясняется участием цитокина в выработке острофазовых белков и снижением синтеза альбумина на фоне воспаления. Умеренная корреляция фактора роста эндотелия и СРБ подтверждают взаимосвязь эндотелиальной дисфункции, неоангиогенеза с процессами воспаления. VEGF также является стимулятором фиброгенеза.

Таким образом, полученные данные позволяют полагать, что высокие уровни VEGF, TNF- α и IL-6 отражают степень активации воспалительного ответа. И, следовательно, прогрессирование ЦП связано с развитием воспалительных, цитолитических, холестатических и фибротических изменений и сопровождается высоким уровнем продукции провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α и VEGF.

Расчетные индексы APRI и МЕЛД при циррозах печени. В группе ЦП выявлено статистически значимое повышение значений расчётного индекса APRI в 2,1 раза в сравнении с группой здоровых лиц ($p < 0,001$) (рис. 9).

Статистически достоверных различий значений индекса APRI у мужчин и женщин с ЦП не выявлено ($p=0,27$).

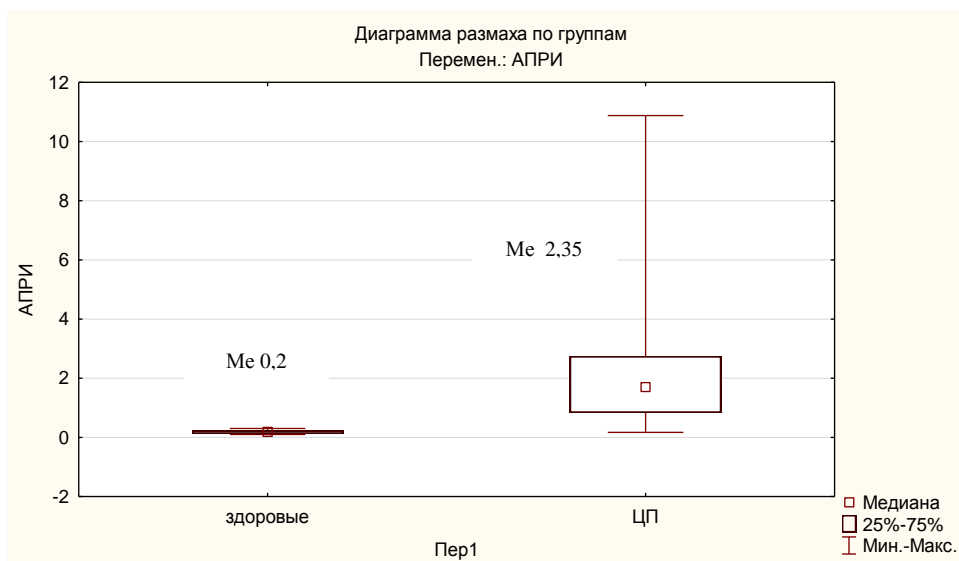


Рис. 9. Значение индекса APRI здоровых пациентов в сравнении с группой больных ЦП.

Значение расчетного индекса MELD в группе больных с ЦП составило 12 баллов (10-15), что составляет вероятность смерти в течение года 59%.

При корреляционном анализе установлены достоверные прямые взаимосвязи расчетного индекса APRI с уровнем АФП ($r_s=0,36$; $p=0,01$, соответственно) (табл. 14), что подчеркивает значение патологической регенерации в прогрессировании заболевания. А также их взаимосвязь с маркерами цитолиза и холестаза, и обратная взаимосвязь индекса APRI с уровнем альбумина ($p=0,001$), что свидетельствует о нарастания цитолиза, холестаза и снижения синтетической функции печени по мере прогрессирования ЦП. Сильная корреляция между индексом APRI и АСТ ($r_s=0,77$) указывает, что более тяжелое поражение печени, связанное с гибелью гепатоцитов, маркирует преимущественно АСТ. В рамках данного исследования также были установлены прямые корреляционные связи индекса MELD с уровнем общего билирубина ($r_s=0,42$; $p<0,001$), креатинина ($r_s=0,36$; $p=0,01$) и значениями МНО ($r_s=0,24$; $p=0,03$), что

подтверждает информативность индекса для выявления тяжелых нарушений функций печени и почек с развитием гепаторенального синдрома (см.табл.14).

Таблица 14

Взаимосвязи индексов APRI, MELD с биохимическими показателями
в группе больных ЦП

Показатели	<i>rs</i>	<i>p</i>
APRI и АЛТ	0,33	0,01
APRI и АСТ	0,77	<0,001
APRI и билирубин общ.	0,34	0,02
APRI и билирубин пр.	0,52	<0,001
APRI и ГГТП	0,33	0,02
APRI и альбумин	-0,48	0,001
APRI и АФП	0,36	0,01
MELD и билирубин	0,42	<0,001
MELD и креатинин	0,36	0,01
MELD и МНО	0,24	0,03

Примечание: *rs* – коэффициент корреляции; *p* - значимость корреляции.

3.3. Сравнительный анализ лабораторных показателей при циррозах печени вирусной, алкогольной и смешанной этиологии.

При сравнении биохимических показателей у больных с ЦП вирусной, алкогольной и смешанной этиологии с помощью межгруппового критерия Краскела – Уоллиса статистически значимых различий между группами не выявлено (табл.15).

Уровень биохимических показателей в сыворотке крови больных ЦП
различной этиологии, Ме (25-75%)

Показатель	Группа кон- троля (n=29)	ЦП вирусный (n=50)	ЦП алкоголь- ный (n=20)	ЦП смешан- ный (n=16)	<i>p</i>
АЛТ, Ед/л	16,9 (14-18,5)	45 (37,5-88,5)	29,5 (23-47)	47,2 (27-59)	0,05
АСТ, Ед/л	19 (17,6-27,7)	65,35 (49-111,5)	58,5 (30-106)	69 (60-105)	0,3
ГГТП, Ед/л	10,9 (9,9-15,6)	44,9(16,6-75,5)	98(57,5-240)	116(16,8-173)	0,09
Билирубин общ, мкмоль/л	10,0 (8,2-14,5)	32,75 (19,3-162)	37,5 (15,7-83,8)	93 (37-204)	0,15
Билирубин пр., мкмоль/л	3,0 (2,4-3,3)	17,45 (11-36,2)	27,5 (13-55,7)	30 (16-108)	0,23
ЩФ, Е/л	56 (47-70)	76,4 (46-135)	164 (91-233,6)	99 (48-146)	0,06
Тимоловая проба, Ед S-H	2,0 (2-3)	7,3 (4,8-10,5)	5,85 (3,92-9)	6 (5,4-10,7)	0,2
Общий белок, г/л	73 (70-79)	71 (64-78)	69 (58-75)	69 (66-85,3)	0,74
Альбумин, г/л	50,2 (45,2-51)	35,25 (27,95-41,5)	32,6 (27,4-41)	36,2 (28-40,8)	0,63
Альбумин, %	52,95 (51,0-57,6)	40,67 (37,36-49,39)	46,94 (36,96-49,71)	39,87 (33,5-42,9)	0,82
α -1-глобулины, %	3,75 (3,39-3,86)	3,67 (3,24-4,05)	4,09 (3,67-5,79)	3,72 (3,34-5,295)	0,06
α -2-глобулины, %	8,91 (8,54-9,8)	9,4 (8,81-10,49)	9,19(7,7-10,47)	8,37 (8,09-9,11)	0,3
β -глобулины, %	13,59 (13,1-14,7)	13,47 (11,9-15,85)	13,28 (11,39-16,85)	14,01 (11,4-17,32)	1,0
γ -глобулины, %	19,95 (17,7-20,7)	31,4 (24,42-35,54)	25,33 (19,48-36,46)	32,79(25,77- 35,43)	0,47
СРБ, мг/л	0,1 (0-0,2)	0,000 (0,0000-12)	12 (0,0000-48)	6 (0,000-16)	0,53
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	262(223-298)	135(88-170)	99,5(80-136)	150(91-159)	1,0
ПТИ, %	100(93-100)	79(60-87)	75(61-88)	73(62-86)	0,64
АФП, МЕ/мл	1,25 (1,08-1,45)	3,45 (2,26-6,44)	2,25 (1,1-4)	4,57 (2,1-6,79)	0,05

Примечание: *p* – значимость различий (ранговый ДА)

При попарном исследовании критерия с помощью Манна - Уитни были получены достоверные различия в группе с алкогольным ЦП. Уровень АФП у

пациентов с вирусным ЦП был достоверно выше, чем у больных с алкогольным генезом заболевания ($p=0,03$), но не имел значимых различий от значений данного показателя в группе со смешанной этиологией процесса ($p=0,55$) (рис. 10).

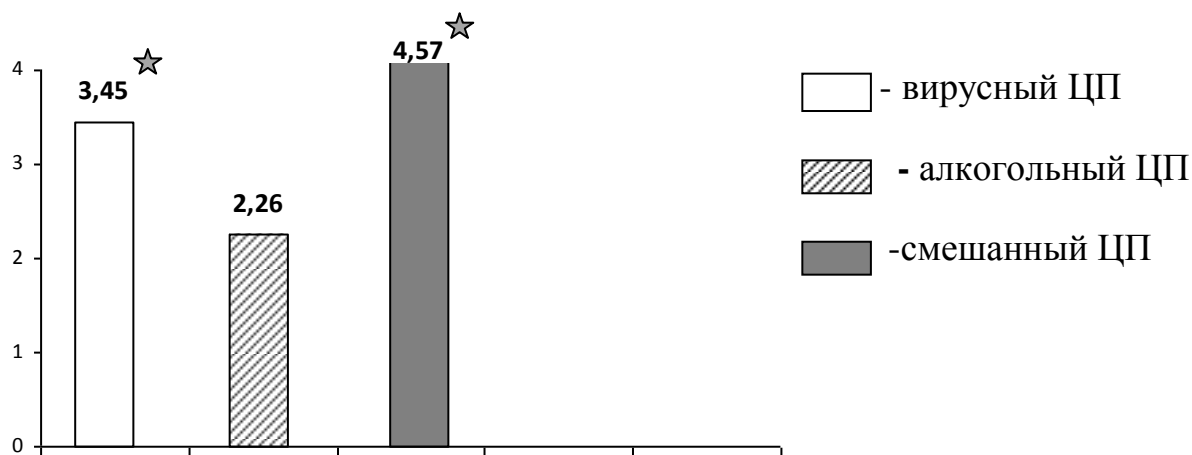


Рис. 10. Уровень АФП у больных ЦП в зависимости от этиологического фактора

При этом пациенты со смешанным ЦП имели более высокие сывороточные концентрации АФП, чем больные с алкогольным генезом заболевания ($p=0,03$).

Таким образом, ЦП вирусной и в большей степени смешанной этиологии сопровождается более активными процессами патологической регенерации в печени, и имеют сходные значения лабораторных тестов.

Уровень сывороточных концентраций цитокинов в группах больных ЦП в зависимости от этиологического фактора не имел достоверных различий (табл.16). Нами установлено, что повышенная выработка IL-1 β , IL-4 IL-6 VEGF и G-CSF отмечается во всех группах. Значения TNF- α также не имели достоверных различий. Таким образом, при ЦП вне зависимости от этиологического фактора, в изменениях цитокинового статуса выявлено преобладание выработки ряда провоспалительных цитокинов и VEGF.

Таблица 16

Цитокиновый профиль больных ЦП вирусной, алкогольной
и смешанной этиологии, Ме (25-75%)

Показатель	Группа контроля (n=29)	ЦП вирусный (n=50)	ЦП алкогольный (n=20)	ЦП смешанный (n=16)	<i>p</i>
TNF- α , пг/мл	0,5(0,1-1,3)	3,6(2,1-6,2)	3,4(2,6-4,0)	3,1(2,7-3,9)	0,3
IL-1 β , пг/мл	3,15(3-3,3)	2,9(2,7-3,2)	2,4(2,2-2,8)	2,8(2,3-3,05)	0,4
IL-4, пг/мл	1,4(1-1,6)	1,7(1,3-2,15)	1,5(1,4-1,8)	1,75(1,5-1,85)	0,3
IL-6, пг/мл	0,6(0,2-2,4)	15,7(34,4-79,7)	37(23,1-79,5)	29,3(7-84,2)	0,5
IFN- γ	9,45 (9-9,8)	9,95 (9,5-10,6)	9,2 (8,7-9,8)	9,8 (9,45-10,3)	0,3
VEGF, пг/мл	86,67 (6,6-187,4)	198,26 (75,9-335,4)	262,86 (156,1-704,55)	151,5 (77,95-313,45)	0,27
G-CSF, пг/мл	8,3 (6,2-15,3)	12,8 (5,4-53)	8,9 (5-63,3)	6,55 (3,75-7,45)	0,06

Примечание: *p* – значимость различий (ранговый ДА).

При сравнительной оценке медианы значений расчетного индекса APRI у больных ЦП вирусной, алкогольной и смешанной этиологии достоверных различий не обнаружено (рис. 11).

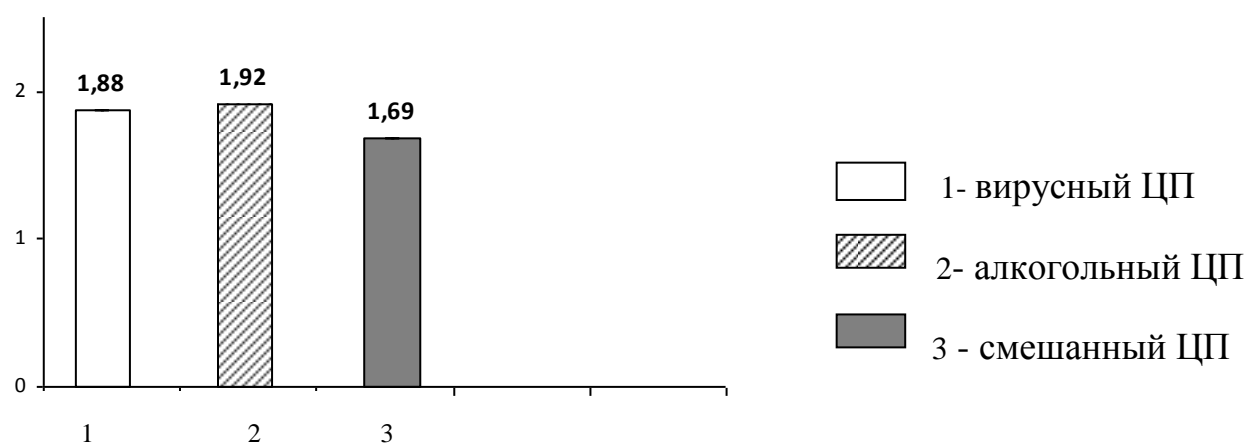


Рис. 11. Значение индекса APRI у больных ЦП в зависимости от этиологии.

При ранговом анализе между группами различной этиологии значения медианы индекса MELD не показали значимых результатов (рис. 12).

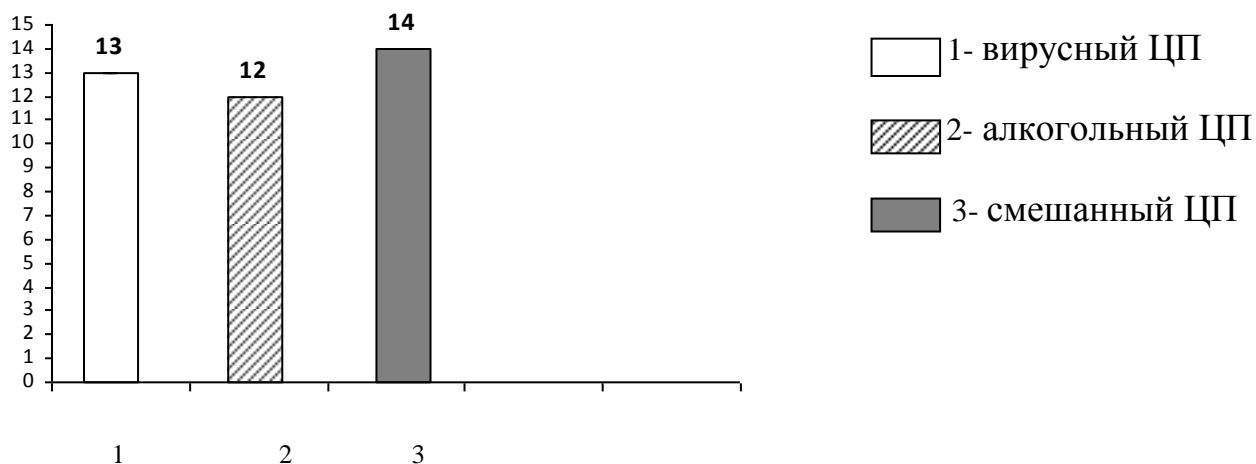


Рис. 12. Значение индекса MELD у больных ЦП в зависимости от этиологии

Полученные данные подтверждают значимость индексов APRI и MELD для верификации ЦП не зависимо от этиологии.

3.4. Сопоставление лабораторных показателей у больных с циррозом печени вирусной этиологии

Анализ биохимических показателей при циррозе печени вирусной этиологии в исходах ХГВ, ХГС и микст - гепатитов с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса не выявил различий между группами больных (табл. 17).

У всех пациентов с ЦП в исходе ХГВ, ХГС и микст-гепатитов отмечено снижение уровня альбумина, повышение тимоловой пробы и СРБ и повышение глобулиновых фракций в сыворотке крови, что связано с печеночно-клеточной недостаточностью, снижением синтетической функции печени и выраженной воспалительной реакцией. Уровень АФП в группах пациентов с вирусным ЦП различного генеза также не имел достоверных различий и составил у больных циррозом в исходе ХГВ 3,51 (2,16-6,44) МЕ/мл, в результате ХГС – 3,5 (2,26-9,46) МЕ/мл и в исходе микст гепатитов – 2,79 (1,86-7,46) МЕ/мл.

Биохимические показатели в группах пациентов с вирусным циррозом различного генеза, Me (25-75%)

Показатель	Группа контроля (n=29)	ЦП в исходе ХГВ (n=10)	ЦП в исходе ХГС (n=30)	ЦП в исходе МИ (n=10)	<i>p</i>
АЛТ, Ед/л	16,9 (14-18,6)	42 (28-56,4)	49,2 (41-100)	42,5 (26-78,5)	0,2
АСТ, Ед/л	19 (17,6-27,5)	66,4 (54-121)	63,2 (49-117)	58,5 (44-80,5)	0,8
ГГТП, Ед/л	10,9 (9,9-15,6)	75,5 (37,4-169)	39,7 (14,8-69)	44,55 (15,9-61,25)	0,06
Билирубин мкмоль/л	10,0 (8,2-14,5)	129,5 (18,4-364,5)	31,5 (19,4-140)	39,35 (22-61,9)	0,06
Билирубин пр., мкмоль/л	3,0 (2,4-3,5)	35 (9,6-77,8)	17 (11-29,3)	15,5(11,95- 28,9)	0,46
ЩФ, Е/л	56(47-70)	101,7 (69,6-210,5)	76 (45-116)	73,5 (53-110,5)	0,3
Тимоловая проба, ЕдS-H	2,0(2-3)	15,8 (7,3-16,7)	5,67 (3,9-9)	8 (5,5-15)	0,2
Общий белок, г/л	73(70-79)	77(69,3-84)	70,5(65-78,5)	67,5 (58,5-72,5)	0,4
Альбумин, г/л	50,2 (45,2-51)	29,8 (27,6-39,35)	35,9 (32,45-41,6)	27,35 (23,5-40,5)	0,11
Альбумин, %	52,95 (51,09-57,6)	37,7 (36-39,44)	44,88 (41,3-50,24)	39,05 (37,36-49,39)	0,14
α-1- глобули- ны, %	3,75 (3,39-3,86)	4,16 (4,14-4,7)	3,73 (2,97-4,01)	3,5 (3,22-3,66)	0,2
α-2- глобули- ны, %	8,91 (8,54-9,8)	9,6 (9,31-10,49)	9,13 (8,81-10,16)	9,87 (7,01-10,51)	0,3
β-глобулины, %	13,59 (13,1-14,7)	16,52 (15,59-16,56)	12,88 (10,9-15,85)	12,47 (11,13-14,2)	0,4

Продолжение табл. 17

γ- глобулины, %	19,95 (17,7-20,7)	30 (27,63-31,4)	29,13 (22,53-34,37)	35,29 (26,1-37,9)	0,5
СРБ, мг/л	0,1(0-0,2)	1,5(0,0-12)	0,0(0,0-0,0)	6(0,0-12)	0,8
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	262 (223-298)	132 (88-164)	129 (68-154)	118 (78-144)	0,3
ПТИ, %	100(93-100)	82 (66-88)	80 (72-86)	79 (68-85)	0,5
АФП, МЕ/мл	1,25 (1,08-1,45)	3,51 (2,16-6,44)	3,5 (2,26-9,46)	2,79 (1,86-7,46)	0,89

Примечание: p – значимость различий (ранговый ДА)

Таким образом, ЦП в исходе ХГВ, ХГС и ХГ-микст сопровождаются сопоставимыми по выраженности процессами патологической регенерации в печени.

Результат сравнительного анализа цитокинового профиля у пациентов с вирусным ЦП в исходе В, С и микст-гепатитов показал, что концентрация цитокинов в сыворотке крови трех исследуемых групп больных с ЦП не имела достоверных различий (табл.18).

Таблица 18

Цитокиновый профиль в группах пациентов с вирусным ЦП различного генеза,
Me (25-75%)

Показатель	Группа сравнения (n=29)	ЦП в исходе гепатита В (n=10)	ЦП в исходе гепатита С (n=30)	ЦП в исходе микст-гепатитов (n=10)	p
TNF-α, пг/мл	0,5(0,1-1,3)	1,9 (1,5-4,5)	3,6 (2,7-9,1)	3,6 (3,05-3,9)	0,3
IL-1β, пг/мл	3,15(3-3,4)	2,9(2,8-3,1)	2,7(2,5-3,3)	2,9(2,65-3,4)	0,22
IL-4, пг/мл	1,4(1-1,4)	1,2(1,2-1,5)	1,9 (1,6-2,6)	2,1 (1,65-2,3)	0,14
IL-6, пг/мл	0,6(0,2-2,2)	18,2 (13,6-24)	12,5 (6,2-36,9)	18,4 (9-44,15)	0,5

Продолжение табл.18

IFN- γ , пг/мл	9,45(9-9,8)	9,7(9,1-10)	9,7(9,1-10,5)	10,55 (10,1-10,95)	0,12
VEGF, пг/мл	86,65 (6,6-187,3)	500 (88-919)	208,2 (75,9-319,9)	99,26 (35,8-198)	0,27
G-CSF, пг/мл	8,3(6,2-15,3)	10,1 (5-53)	16,2 (6,5-32,2)	12,75 (8,35-52,1)	0,7

Примечание: p – значимость различий.

Таким образом, ЦП в исходе хронических гепатитов В, С и микст-гепатитов, сопровождается общим увеличением продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что может свидетельствовать о едином патогенетическом механизме, в основе которого дисбаланс цитокиновой регуляции патологического процесса.

Показатели расчетных индексов. Достоверных различий медианы значений индекса APRI у больных вирусным ЦП в исходе ХГВ, ХГС и ХГ-МИКСТ не выявлено. У пациентов с ЦП в исходе ХГВ индекс APRI равнялся 1,8 (1,6-4,6), в группе с ЦП в исходе ХГС – 2,0 (0,9-3,4), у больных с ЦП в исходе ХГ-МИКСТ индекс APRI составил 1,98 (1,1-2,3) (рис. 13).

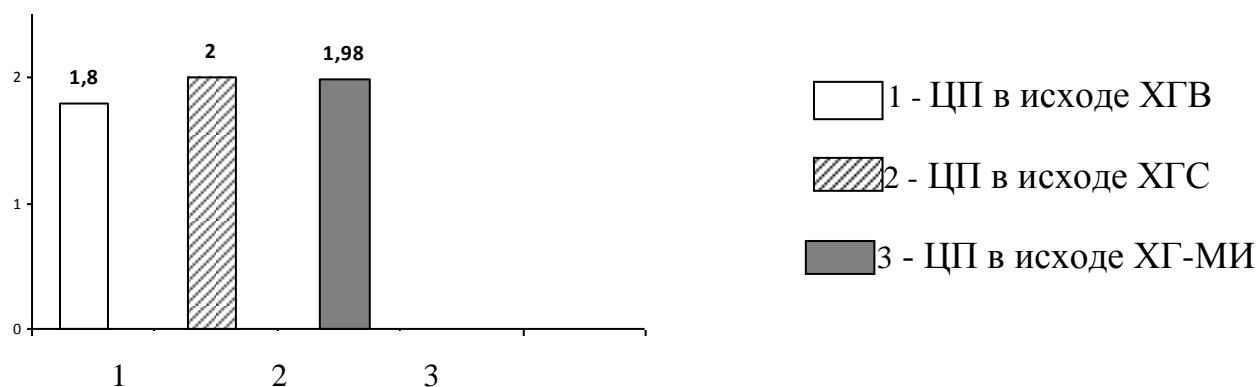


Рис. 13. Значение индекса APRI у больных вирусным ЦП различной этиологии.

Уровень медианы индекса MELD во всех группах статистически не отличался.

Таким образом, индексы позволяют диагностировать ЦП, независимо от этиологии.

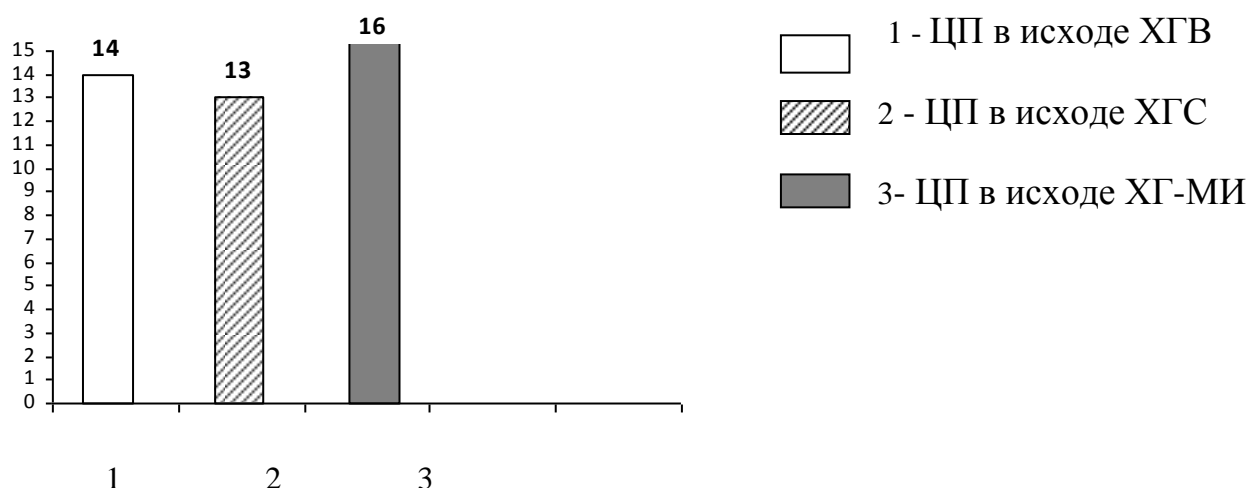


Рис. 14. Значение индекса MELD у больных вирусным ЦП в исходах гепатитов В, С и микст-гепатитов.

3.5. Оценка лабораторных тестов в зависимости от класса тяжести цирроза печени

По результатам стандартных лабораторных тестов при анализе значимости различий между группами пациентов по мере прогрессирования ЦП достоверно нарастала (см.табл. 19) выраженность синдромов цитолиза по уровню АСТ ($p=0,03$), холестаза по данным билирубина и его фракций ($p=0,02$ и $p=0,04$), ГГТП и ЩФ ($p=0,03$ и $p=0,03$), воспаления по С-реактивному белку и процентному содержанию γ -глобулинов ($p=0,02$ и $p=0,04$), печеночной недостаточности по уровню медианы общего белка ($p=0,04$) и альбумина ($p=0,03$) снижение протромбинового индекса и тромбоцитов ($p=0,01$ и $p=0,03$).

Таблица 19
Лабораторные показатели у больных ЦП по классам тяжести, Ме (25-75%)

Показатель	Группа контроля (n=29)	ЦП класс А (n=25)	ЦП класс В (n=29)	ЦП класс С (n=32)	<i>p</i>
АЛТ, Е/л	16,9(14-18,6)	44(25-100)	43,5(27-66,7)	45(29-60,75)	0,3
АСТ, Е/л	19(17,6-27,5)	42(30-74)	55,5(49-95)	79,5 (65,1-132,5)	0,03
ГГТП, Е/л	10,9 (9,9-15,6)	27 (12,9-39)	46,35 (21-140)	99,5 (31,3-192)	0,03

Продолжение табл.19

Билирубин общ, мкмоль/л	10,0(8,2-14,5)	11,95 (6-14,8)	21,65 (14,5-37,95)	49,25 (26,2-109,7)	0,02
Билирубин пр., мкмоль/л	3,0(2,4-3,5)	66 (25-164)	56 (9,17-134)	71,5 (37,43-152,8)	0,04
Креатинин, мкмоль/л	66,3(52-71)	70(56-78)	77(61-85,5)	97(64-140)	0,04
ЩФ, Е/л	56(47-70)	66 (45-127)	125 (58-184,2)	114(78,2-188)	0,03
Тимоловая проба, ЕдS-H	2,0(2-3)	5,8(3-8)	5,85(4,9-9)	8,36(5-13,7)	0,04
Общий белок, г/л	73(70-79)	74 (67-81)	70(65-79)	68(54,75-72,5)	0,04
Альбумин, г/л	50,2(45,2-51)	42 (39-46,3)	34,55 (29,75-37,7)	28 (25,3-32,3)	0,03
Альбумин, %	52,95 (51,09-57,6)	50,2 (45,56-54,05)	40,25 (36,7-43,4)	36,96 (33,14-40,21)	0,03
α -1- глобулины, %	3,75(3,39-3,86)	3,69 (3,38-4,05)	3,77 (3,45-4,43)	4,16(3,22-6,45)	0,3
α -2- глобулины, %	8,91 (8,54-9,8)	9,19 (8,36-10,1)	8,74 (8,09-9,24)	10,07(7,52-10,7)	0,5
β -глобулины, %	13,59 (13,1-14,7)	13,84 (12,3-15,85)	13,99 (12,00-16,97)	12,47 (11,15-16,58)	0,4
γ -глобулины, %	19,95 (17,7-20,7)	24,78 (20,24-26,86)	33,19 (18,9-36,56)	35,15 (21,41-37,76)	0,04
СРБ, мг/л	0,1(0-0,2)	8,8 (0,0-12,0)	6,8 (0,0-12)	12(10-48)	0,02
Тромбоциты, 10^9 /л	262(223-298)	267,5 (243,5-309)	118 (107-127)	67,5(62-78)	0,03
ПТИ, %	98(77-120)	96,7 (87,6-110,3)	79 (68,2-87)	52(41-60)	0,01
АФП, МЕ/мл	1,0 (0,84-1,1)	2,39 (1,52 – 3,51)	2,85 (2,13 – 5,93)	4,41 (3,16 – 11,9)	0,04

Примечание: p – значимость различий, H-критерий Краскела – Уоллиса (ранговый ДА)

Следует отметить, что уровень АЛТ и процентное содержание α - и β -глобулинов были существенно не изменены и не отличались результатами.

При корреляционном анализе в группе с ЦП обнаружены достоверные прямые взаимосвязи стадии тяжести заболевания с АСТ ($p=0,001$), фракциями билирубина, ЩФ ($p=0,04$), СРБ ($p=0,001$), γ -глобулином ($p=0,02$), а также обратные взаимосвязи с концентрацией общего белка ($p=0,03$) и альбумина ($p<0,001$) (табл.20).

Взаимосвязи лабораторных показателей с классом тяжести ЦП

Показатель	<i>rs</i>	<i>p</i>
Класс тяжести и АСТ	0,37	0,001
Класс тяжести и билирубин общий	0,41	<0,001
Класс тяжести и билирубин прямой	0,53	<0,001
Класс тяжести и ЩФ	0,22	0,04
Класс тяжести и общий белок	-0,25	0,03
Класс тяжести и альбумин	-0,69	<0,001
Класс тяжести и γ -глобулин	0,31	0,02
Класс тяжести и СРБ	0,42	0,001
Класс тяжести и тромбоциты	-0,35	0,03
Класс тяжести и ПТИ	-0,27	0,02
Класс тяжести и МНО	0,24	0,03

Примечание: *rs* – коэффициент корреляции; *p* – значимость корреляции.

Таким образом, маркеры цитолиза, холестаза, воспаления, гемостаза и печёночной недостаточности отражают патологические процессы в печени, независимо от этиологического фактора, коррелируют с классом тяжести заболевания по Чайлд-Пью.

Уровень АФП в сыворотке крови у больных с классом тяжести В составил 2,85 (2,13 – 5,93) МЕ/мл, хотя и имел тенденцию к повышению, но без значимых отличий от компенсированной стадии – 2,39 (1,52 – 3,51) МЕ/мл ($p=0,21$) (рис. 15).

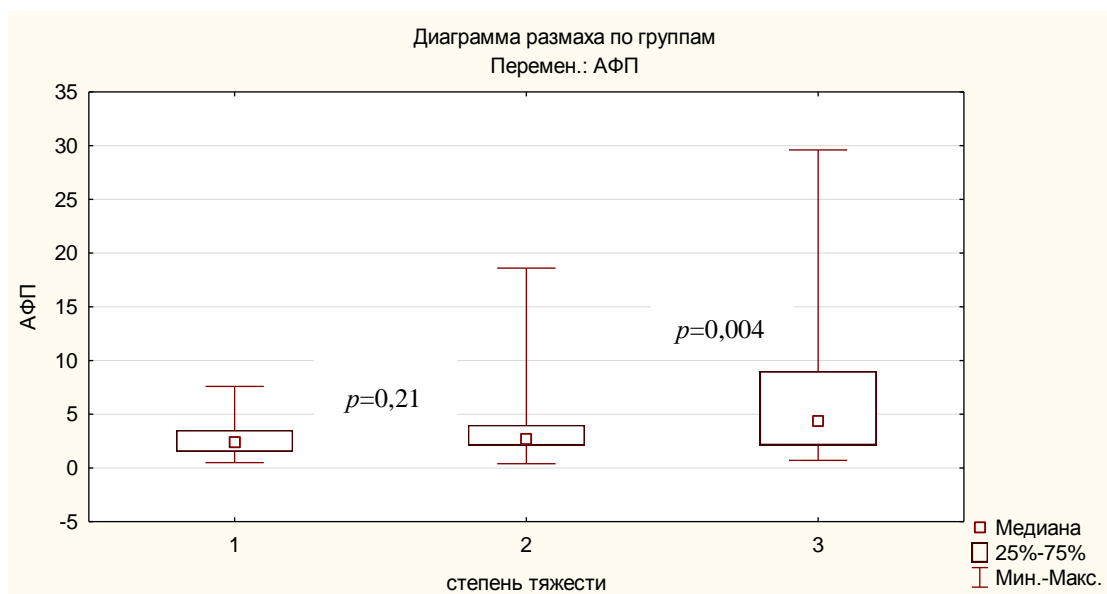


Рис. 15. Класс тяжести ЦП и уровень АФП.

1- класс А; 2- класс В; 3- класс С.

При этом сывороточная концентрация данного маркера у пациентов с декомпенсированным ЦП равнялась 4,41 (3,16 – 11,9) МЕ/мл, что было достоверно выше, чем в группах с компенсацией и субкомпенсацией заболевания ($p=0,01$ и $p=0,03$, соответственно)

Таким образом, механизмы патологической регенерации в печени нарастают по мере прогрессирования ЦП, что подтверждается прямой взаимосвязью концентрации АФП со степенью тяжести ЦП по шкале Чайлд-Пью ($r_s = 0,35$; $p=0,004$). Определение сывороточного уровня АФП позволяет дифференцировать компенсированную и субкомпенсированную стадии ЦП от декомпенсации заболевания.

Результат цитокинового исследования. С целью изучения иммунорегуляторного ответа в зависимости от выраженности патологического процесса нами были изучены сывороточные концентрации цитокинов в зависимости от класса ЦП (табл.20). В результате исследования установлено, что по мере прогрессирования ЦП уровни концентрации цитокинов значительно повышались. Критерий Краскела-Уоллиса показал достоверно значимые результаты измене-

ния продукции выработки IL-6 ($p<0,001$), TNF- α ($p=0,01$), VEGF($p<0,001$) и G-CSF ($p=0,04$) . При попарном сравнении групп с помощью критерия Манна-Уитни уровень IL-6 у пациентов с субкомпенсированным ЦП (класс В) был выше в 3 раза, чем при компенсированной стадии ($p<0,001$), а также имел достоверные различия у больных с декомпенсированным ЦП ($p<0,001$) и уровень медианы вырос ещё в 3,2 раза. Концентрация VEGF в 3 раза повышалась на стадии тяжелого цирроза ($p<0,001$). Концентрация G-CSF в 2,7 раза повышалась на стадии декомпенсации цирроза ($p=0,04$), хотя в пределах референтных значений. Провоспалительный цитокин TNF- α значительно увеличивались при переходе в субкомпенсированную стадию заболевания ($p=0,01$) (табл. 21).

Таблица 21

Цитокиновый профиль у больных ЦП с различными классами тяжести
Me (25-75%)

Показатель	Группа контроля (n=29)	ЦП класс А (n=25)	ЦП класс В (n=29)	ЦП класс С (n=32)	<i>p</i>
TNF- α пг/мл	0,5(0,1-1,4)	2,7 (2,5-3,3)	3,6 (3,0-4,8)	3,(2,9-9,7)	0,01
IL-1 β пг/мл	3,2(3-3,3)	2,7 (2,3-2,9)	2,95 (2,5-3,25)	2,(2,2-2,9)	0,42
IL-4 пг/мл	1,4(1-1,4)	1,6 (1,3-2,1)	1,8(1,7-2,2)	1,(1,2-1,7)	0,06
IL-6 пг/мл	0,6 (0,2-2,4)	6,6 (4,9-9,6)	19,8 (12,3-24,7)	57,8 (33,1-127,6)	<0,001
IFN- γ пг/мл	9,45(9-9,8)	9,4 (9,15-9,9)	10 (9,45-10,5)	9,6 (8,8-10,2)	0,3
VEGF пг/мл	86,64 (6,6-186,4)	110,85 (77,5-245,8)	125,5 (57,1-201,7)	376,85 (210,2-635)	<0,001
G-CSF пг/мл	8,3 (6,2-15,3)	6,1 (5,0-12,8)	9,4 (4,95-24,45)	24,8 (5-64,9)	0,04

Примечание: *p*- значимость различий, *H*-критерий Краскела – Уоллиса (ранговый ДА).

Таким образом, развитие и утяжеление процесса в печени при циррозе сопровождается гиперпродукцией провоспалительных цитокинов IL-6 , TNF- α

и факторов роста и в меньшей степени IL-4, что указывает на активную роль иммунного воспалительного процесса даже на поздних стадиях заболевания.

Корреляционные взаимосвязи цитокинов IL-6, TNF- α с функциональными показателями отражают класс тяжести заболевания. Увеличение концентрации VEGF и G-CSF также связаны с активацией процессов ангиогенеза и воспаления при прогрессировании ЦП (табл. 22). При этом сильные корреляции выявлены между стадией ЦП и IL-6, умеренные с VEGF, слабые с TNF- α и G-CSF. Полученные данные позволяют полагать, что степень повышения провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6, VEGF и G-CSF способствует усугублению клинического варианта течения цирроза, а их сывороточная концентрация отражает степень воспалительной реакции и тяжесть патологического процесса.

Таблица 22

Корреляции концентрации цитокинов с классом тяжести ЦП

Показатель	<i>rs</i>	<i>p</i>
Класс тяжести и IL-6	0,75	<0,001
Класс тяжести и TNF- α	0,31	0,004
Класс тяжести и VEGF	0,45	<0,001
Класс тяжести и G-CSF	0,3	0,02

Примечание: *rs* – коэффициент корреляции по Спирмену; *p* – значимость корреляции.

В пользу данного утверждения свидетельствуют выявленные взаимосвязи изучаемых цитокинов с такими показателями тяжести заболевания, как маркеры цитолиза, холестаза, печёночной недостаточности и воспалительного синдрома.

Значения расчетных индексов. Индекс APRI достоверно увеличивался с нарастанием класса тяжести ЦП и составил в группе с компенсированным циррозом (А) – 0,79 (0,6-1,05), с субкомпенсированным (В) – 1,65 (1,13-2,2), с де-

компенсированной стадией (С) – 2,5 (2,13-2,87) (рис. 16).

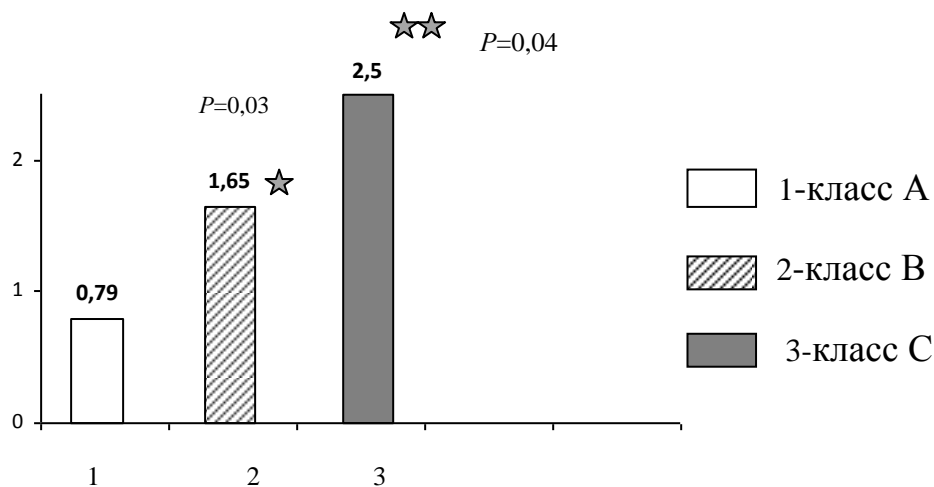


Рис. 16. Значения индекса APRI в зависимости от класса тяжести ЦП

Найдена прямая взаимосвязь индекса APRI с классом тяжести ЦП по шкале Чайлд–Пью ($r_s = 0,76$; $p < 0,001$). Эти данные свидетельствуют о возможности использования индекса не только для стратификации гепатита и цирроза, но и для стратификации класса ЦП.

Значения расчетного индекса MELD имели достоверно значимое увеличение на стадии В и С при ЦП ($p = 0,02$). (рис. 17).

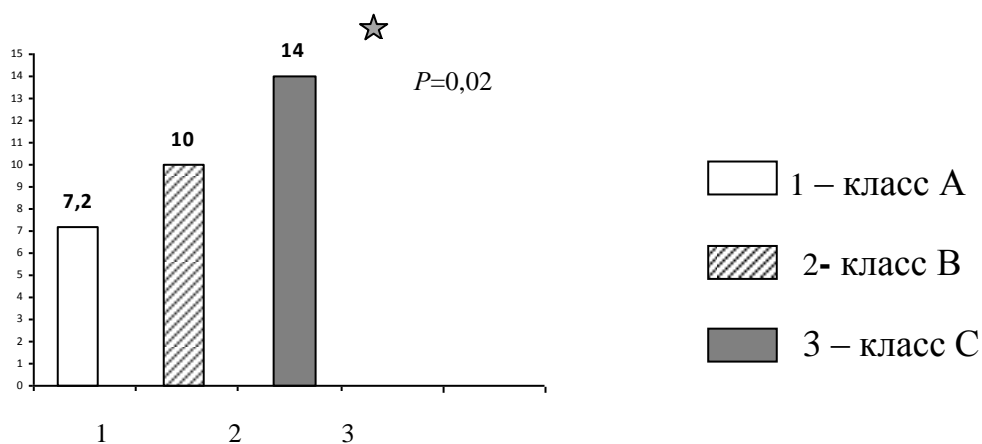


Рис. 17. Значения индекса MELD в зависимости от класса тяжести цирроза.

И составили при классе А – 7,2 (6-9), классе В – 10 (8-11), а при декомпенсированном (класс С) – 14 (12-18). Найдена прямая корреляция расчетного индекса MELD с классом тяжести ЦП ($r_s=0,64$; $p=0,005$ по критерию Спирмена).

Таким образом, расчет данных индексов у больных с циррозом позволяют уточнить не только наличие ЦП, но и отражают тяжесть патологического процесса и прогрессирование поражения печени.

РЕЗЮМЕ

Изучив особенности клинических симптомов и лабораторных показателей у больных ЦП, мы выделили ведущие клинические синдромы: синдром портальной гипертензии, астенический, диспептический, желтушный, воспалительный. Несмотря на схожесть процентного соотношения встречаемости симптомов, отмечалась повышенная частота выявляемой воспалительной реакции и диспепсического синдрома при алкогольном ЦП. При ЦП смешанного генеза доля патологических клинических проявлений возрастала по сравнению с другими ЦП, что еще раз подтверждает пагубное сочетанное воздействие алкоголя и гепатотоксичности вирусной инфекции.

По лабораторным исследованиям выделены основные клинико-лабораторные синдромы. К ним относятся синдромы цитолиза, холестаза печечно-клеточной недостаточности и воспаления. Зафиксировано повышение сывороточной концентрации АФП и его способность отражать степень поражения печени, что свидетельствует о патологической регенерации печени.

При анализе взаимосвязи между клиническими симптомами и цитокинами нами получены достоверно значимые зависимости, что подтверждает их патогенетическую значимость в прогрессировании заболевания. По мере нарастания патологического процесса выраженность клинических симптомов нарастает, и имеет сильную корреляцию со стадией заболевания.

Для цирроза печени вне зависимости от этиологического фактора характерны изменения цитокинового статуса, что свидетельствует о дисбалансе цитокиновой регуляции воспаления.

Уровень цитокинов IL-6, TNF- α , VEGF и G-CSF при циррозе отражает выраженность воспалительного ответа и тяжесть патологического ответа, что подтверждается выявленными взаимосвязями их со стадией заболевания.

Индексы APRI и MELD позволяют верифицировать классы тяжести ЦП и имеют прямые взаимосвязи с лабораторными тестами, а также отражают тяжесть патологического процесса.

Глава 4. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЦИТОКИНОВ И ИНДЕКСОВ APRI и MELD ДЛЯ СТРАТИФИКАЦИИ КЛАССА ТЯЖЕСТИ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

4.1. Диагностическая ценность определения уровней концентрации цитокинов

Результат ROC-анализа исследуемого цитокина IL-6 для дифференциации класса тяжести А и класса тяжести В при ЦП показал хорошее качество модели, AUC составил $0,902 \pm 0,01$ (доверительный интервал 0,81-0,96), $p < 0,001$ (рис. 18).

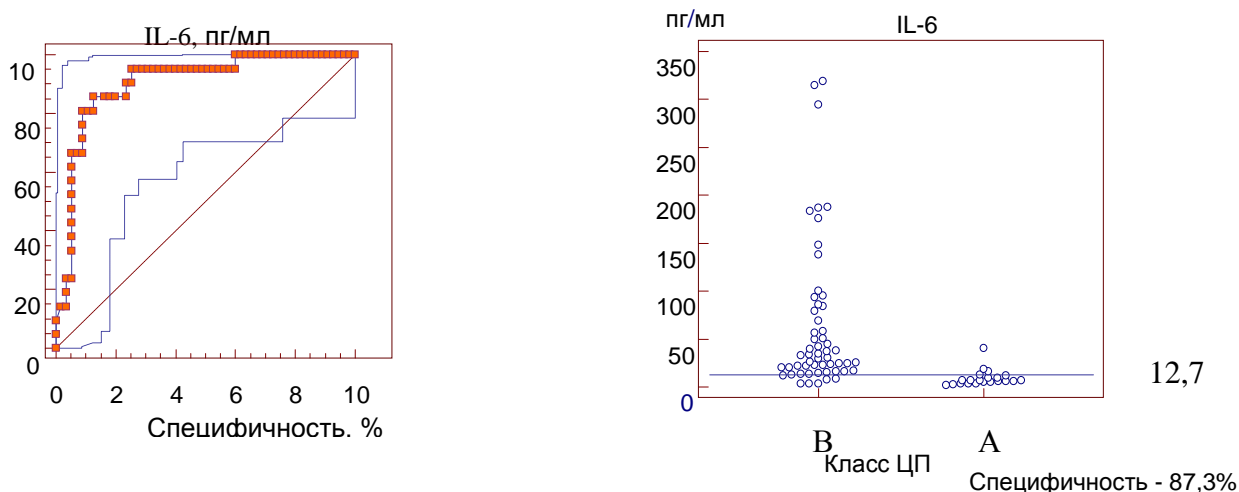


Рис. 18. ROC-кривая и значения IL-6 при классе А и классе В при ЦП. Индекс Юдена (J) = 0,73. Пороговое значение IL-6 = 12,7 пг/мл при чувствительности – 85,7% и специфичности – 87,3% .

Предлагаемый анализ диагностической значимости IL-6 для дифференциации класса В и класса С при ЦП показал хорошую оценку качества модели AUC и составил $0,88 \pm 0,04$ (доверительный интервал 0,76-0,95), $p < 0,001$ (рис. 19).

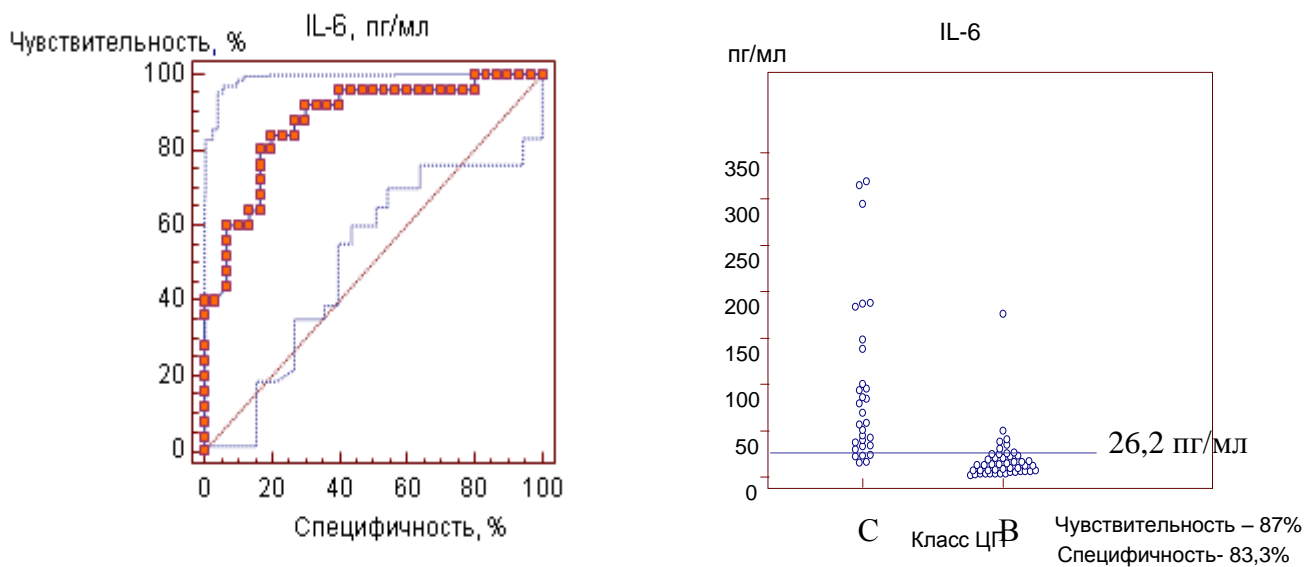


Рис. 19. ROC-кривая и значения IL-6 при классе В и классе С при ЦП. Индекс Юдена (J) = 0,63. Пороговое значение 26,2 пг/мл.

В качестве дополнительного маркера мы предлагаем также использовать определение сывороточного уровня TNF- α (рис. 20).

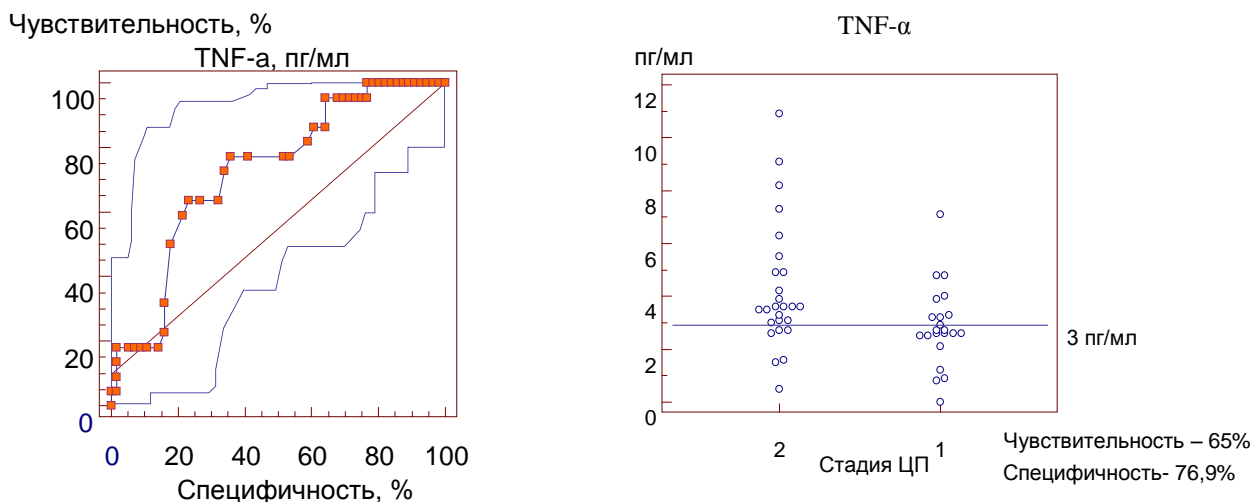


Рис. 20. ROC-кривая и значения TNF- α при классе А и классе В при ЦП. Индекс Юдена (J) = 0,41. Оптимальное пороговое значение TNF- α = 3 пг/мл при чувствительности – 65% и специфичности – 76,9% .

В качестве дополнительных неинвазивных маркеров для дифференциации субкомпенсированной (класс В) и декомпенсированной стадии (класс С) ЦП мы предлагаем также использовать определение сывороточных уровней VEGF и G-CSF.

Анализ диагностической значимости определения уровня VEGF для дифференциации данных стадий ЦП показал хорошее качество модели и AUC составил $0,83 \pm 0,06$ (доверительный интервал $0,69-0,92$), $p < 0,001$

(рис. 21).

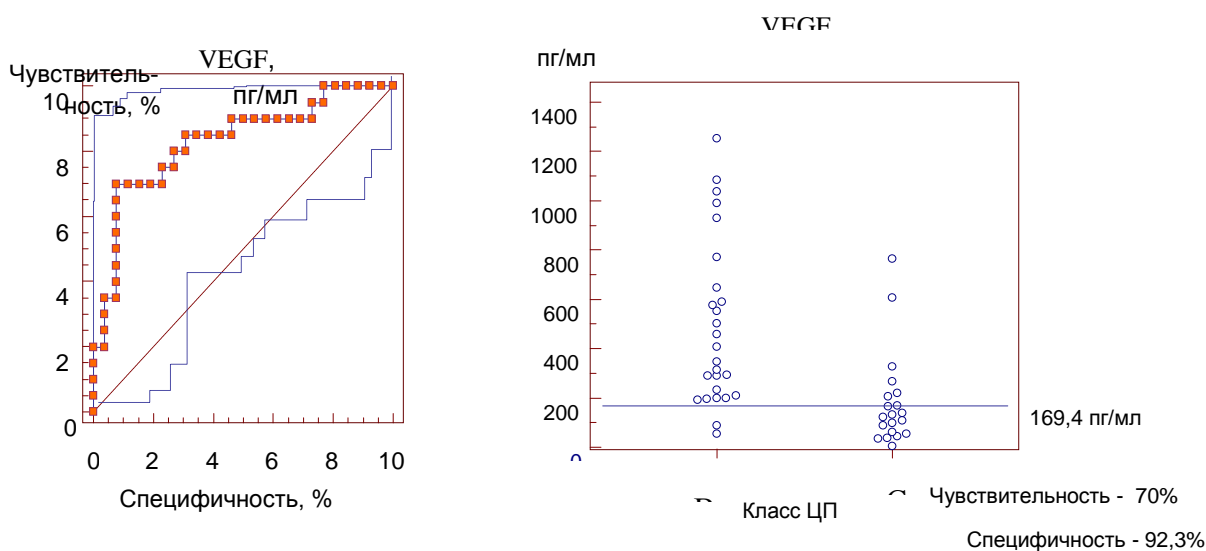


Рис. 21. ROC-кривая и значения VEGF при субкомпенсированной (класс В) и декомпенсированной стадии (класс С) при ЦП. Индекс Юдена (J) = 0,62. Оптимальное пороговое значение VEGF = 169,4 пг/мл при чувствительности – 70% и специфичности – 92,3% .

Площадь ROC-кривой G-CSF для дифференциации класса В и класса С при ЦП составила AUC $0,63 \pm 0,08$ (доверительный интервал $0,5-0,77$), $p = 0,04$ (рис. 22).

Таким образом, уровень концентрации IL-6 более 12,7 пг/мл и менее 26,2 пг/мл, уровне TNF- α более 3 пг/мл позволяет определять класс А при ЦП. А при значении IL-6 более 26,2 пг/мл, уровне VEGF более 169,4 пг/мл и кон-

центрации G-CSF более 16,7 верифицируют декомпенсированную (класс С) стадию ЦП с чувствительностью 65-87% и специфичностью 61,5-92,3%.

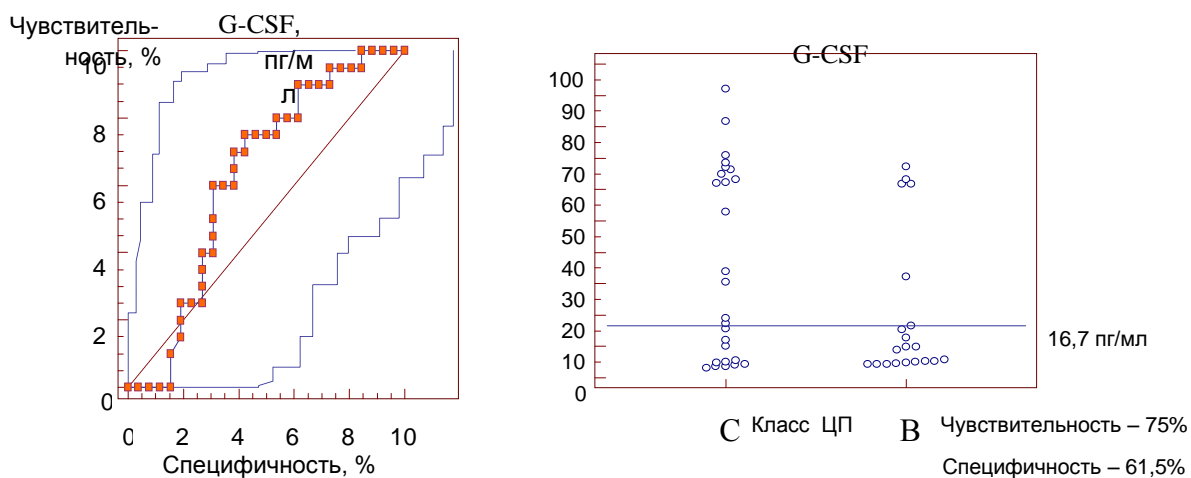


Рис. 22. ROC-кривая и значения G-CSF при классе В и классе С при ЦП. Индекс Юдена (J)= 0,43.

Наиболее значимой диагностической ценностью для диагностики ЦП полезен провоспалительный цитокин IL-6 ($J=0,73$ и $0,64$), позволяющий диагностировать классы заболевания с очень хорошей чувствительностью и специфичностью (табл.23)

Таблица 23

Результаты ROC-анализа для дифференциации классов цирроза
пороговые уровни и значения индекса Юдена

Тест	Пороговые значения между	Индекс Юдена (J)	Точка разделения	ДЧ,%	ДС,%	ДИ
IL-6	класс А и В	0,73	12,7пг/мл	85,7	87,3	0,81-0,96
	класс В и С	0,64	26,2пг/мл	87	83,3	0,76-0,95
TNF- α	класс А и В	0,41	3пг/мл	65	76,9	0,6-0,84
VEGF	класс В и С	0,62	169,4пг/мл	70	92,3	0,69-0,92
G-CSF	класс В и С	0,43	16,7пг/мл	75	61,5	0,5-0,77

Примечание: ДЧ-диагностическая чувствительность, ДС-диагностическая чувствительность, ДИ-доверительный интервал.

Данные тесты повышают точность дифференциации классов тяжести заболевания, что является более объективным подходом по сравнению с классификацией Чайлд-Пью. Критерий энцефалопатии, а также преобладающего асцита являются относительно субъективными показателями. В качестве патогенетически значимых дополнительных критериев для оценки выраженности воспалительной реакции в различных интегральных схемах возможно определение сывороточные концентрации TNF- α , IL-6, VEGF и G-CSF.

4.2. Оценка значений расчетных индексов APRI и MELD

В рамках данного исследования была установлена корреляционная связь функционального класса ЦП по шкале Чайлд-Пью с расчетными индексами APRI ($r_s=0,76$; $p<0,001$) и MELD ($r_s=0,64$; $p=0,005$).

Значение площади под ROC-кривой индекса APRI для дифференциации классов тяжести ЦП составило AUC $0,927\pm 0,05$ (доверительный интервал $0,81-0,98$), $p<0,001$ (рис. 23), что по экспертной шкале соответствует очень хорошей прогностической модели.

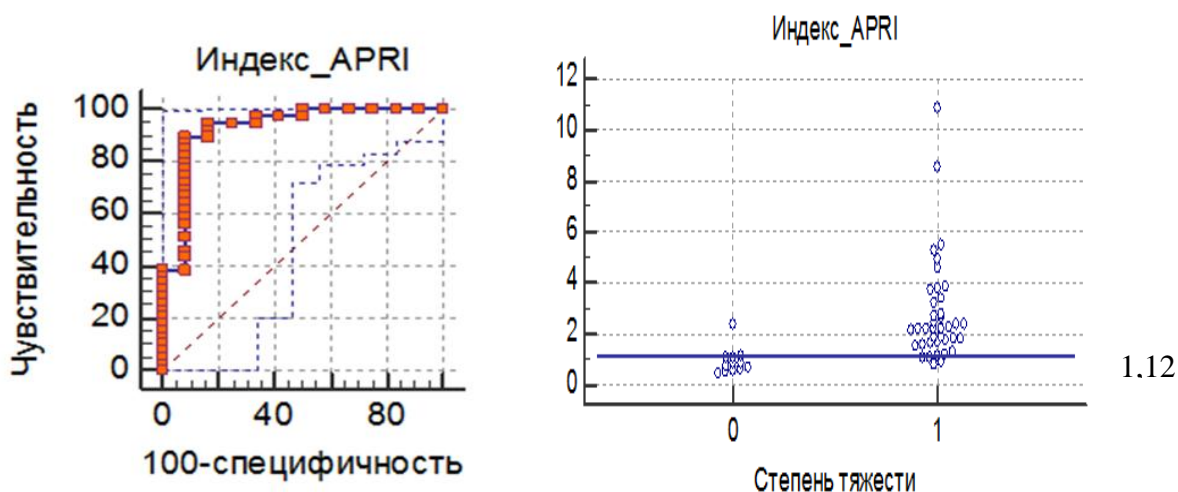


Рис. 23. ROC-кривая и значения индекса APRI у больных ЦП компенсированной (0) – класс А и субкомпенсированной (1) стадии – класс В.

Пороговое значение = 1,12; индекс Юдена (J)= 0,81 при чувствительности – 89,7% и специфичности – 91,7% .

Точкой разделения для класса А при ЦП от класса В было значение 1,12. Оптимальное пороговое значение индекса APRI для дифференциации класса В и класса С при ЦП равнялось 1,78 при чувствительности – 90,9% и специфичности – 68,8%.

Таким образом, при значении индекса APRI менее или равном 1,12 диагностируют класс тяжести А ЦП, при индексе более 1,12 и менее или равном 1,78 устанавливают класс тяжести В, а при значении APRI более 1,78 верифицируют класс тяжести С с чувствительностью 89,7-90,9% и специфичностью 68,8-91,7%.

Площадь ROC-кривой индекса MELD для различия класса В от класса С у больных ЦП составила $AUC\ 0,856\pm 0,06$ (доверительный интервал 0,67-0,95); ($p<0,001$) (рис.24).

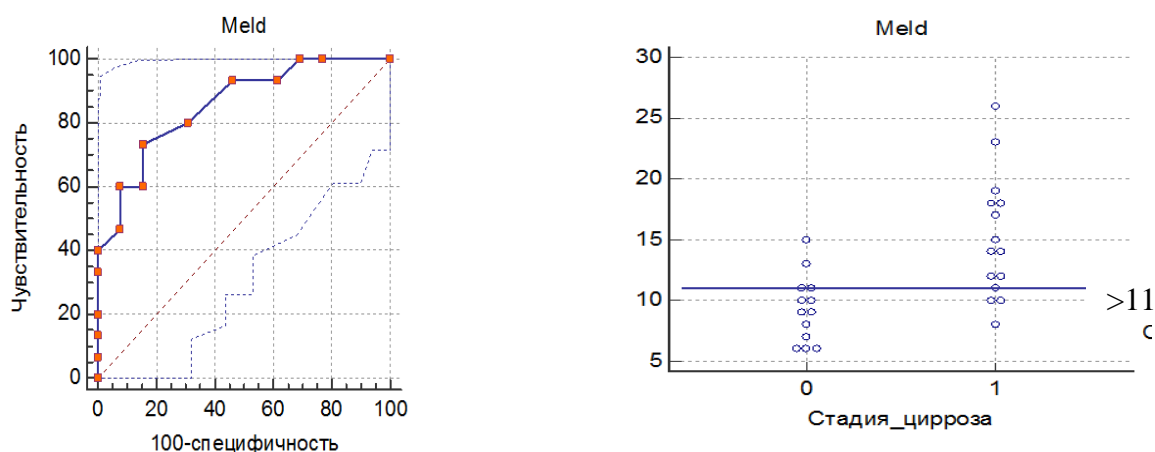


Рис. 24. ROC-кривая и значения индекса MELD при субкомпенсированной (0) стадии – класс В и декомпенсированной (1) – класс С ЦП. Индекс Юдена (J)= 0,58 при чувствительности – 73,3% и специфичности – 84,6% .

Таким образом, при значении индекса MELD менее или равном 11 возможно диагностировать класс тяжести В ЦП, а при значении данного индекса более 11 верифицировать как класс ЦП с чувствительностью 73,3% и специфичностью 84%.

4.3. Клинические примеры

Пример 1. В отделение гастроэнтерологии ГБУЗ КМСЧ №1 г. Перми поступил больной Д., 34 года. При поступлении пациент предъявлял жалобы на снижение аппетита, слабость, небольшое увеличение живота в объеме, тяжесть в правом подреберье. При объективном исследовании выявлены субиктеричность склер, гепатомегалия (+3 см ниже реберной дуги), селезенка не пальпируется, признаки хронической алкогольной интоксикации. В анамнезе имелись данные о систематическом приеме алкоголя в среднем 1 бутылку водки в неделю. В общем анализе крови - гемоглобин 136 г/л, лейкоциты $10,5 \times 10^9$ /л, СОЭ 5 мм/ч. В биохимическом анализе крови - альбумин 45,3 г/л, общий билирубин 15,4 мкмоль/л. Протромбиновый индекс 88%. По данным ЭГДС - варикозное расширение вен пищевода 1 степени. Серологические маркеры вирусов гепатита В, С и Д не обнаружены. Пациенту был впервые установлен диагноз ЦП в исходе алкогольного гепатита, по шкале Чайлд-Пью - класс А (5 баллов). Концентрация IL-6 в сыворотке крови составила 9,1 пг/мл, уровень TNF- α – 2,6 пг/мл, что свидетельствует о компенсированной стадии ЦП, соответствующей классу тяжести А.

Пример 2. В инфекционное отделение №2 ГБУЗ ПК ПККИБ г. Перми поступил больной П., 60 лет, с диагнозом ЦП вирусной (НСV) этиологии (диагноз установлен 4 года назад). При поступлении пациент предъявлял жалобы на слабость, зуд кожи, отеки, увеличение живота, одышку при физической нагрузке, носовые кровотечения. При поступлении состояние средней тяжести. При объективном исследовании выявлены субиктеричность склер, следы расчесов на теле, телеангиоэктазии, пастозность голеней и стоп, асцит, гепатомегалия,

спленомегалия. Печеночная энцефалопатия 1 ст. В общем анализе крови - гемоглобин 168 г/л, лейкоциты $10,9 \times 10^9$ /л, СОЭ 13 мм/ч. В биохимическом анализе крови - альбумин 34,7 г/л, общий билирубин 128 мкмоль/л. Протромбиновый индекс 66%. По данным ЭГДС - варикозное расширение вен пищевода и желудка 1-2 степени. По шкале Чайлд-Пью - класс В (9 баллов). Сывороточный уровень IL-6 составил 15,7 пг/мл, что подтверждает класс тяжести В ЦП.

Пример 3. В инфекционное отделение №2 ГБУЗ ПК ПККИБ г. Перми поступила больная Ч., 38 лет, с диагнозом ЦП смешанной этиологии (HCV, HBV, алкоголь). Диагноз установлен впервые. При поступлении больная предъявляла жалобы на отсутствие аппетита, общую слабость, изжогу, увеличение живота, неустойчивый стул, зуд кожи, носовые кровотечения. При объективном исследовании выявлены иктеричность кожи и склер, следы расчесов на теле, телеангиоэктазии, выраженный асцит, отеки голеней, гепато- и спленомегалия, дефицит массы тела (индекс массы тела 21,4 кг/м), признаки хронической алкогольной интоксикации. Печеночная энцефалопатия 2 степени. В общем анализе крови - гемоглобин 99 г/л, лейкоциты $1,5 \times 10^9$ /л, СОЭ 27 мм/ч. В биохимическом анализе крови - альбумин 33 г/л, общий билирубин 253 мкмоль/л. Протромбиновый индекс 62%. Обнаружены серологические маркеры гепатитов В и С: HbsAg, анти-Hbcor IgG, анти-HCV IgG. По данным ЭГДС - варикозное расширение вен пищевода и желудка 2-3 степени. По шкале Чайлд-Пью - класс С (13 баллов). Уровень IL-6 в сыворотке крови составил 39,4 пг/мл, концентрация VEGF равнялась 198 пг/мл, G-CSF - 62 пг/мл, что свидетельствует о тяжелой (декомпенсированной) стадий ЦП и соответствует классу тяжести С.

РЕЗЮМЕ

В результате исследования нами установлено, что уровни IL-6, TNF- α , VEGF и G-CSF при циррозе отражают выраженность воспалительного ответа, что подтверждается выявленными взаимосвязями этих тестов со стадиями заболевания. Для возможности индивидуального использования значимых цито-

кинов при определении стадии ЦП были построены графики ROC кривых, с помощью которых рассчитаны пороговые величины для стратификации класса тяжести ЦП.

Класс А при ЦП диагностируют при значении IL-6 в сыворотке крови менее или равном 12,7 пг/мл, уровне TNF- α менее или равном 3 пг/мл.

При концентрации IL-6 более 12,7 пг/мл и менее или равной 26,2 пг/мл, уровне TNF- α более 3 пг/мл устанавливают класс В заболевания, а при значении IL-6 более 26,2 пг/мл, уровне VEGF более 169,4 пг/мл и концентрации G-CSF более 16,7 верифицируют класс с цирроза с чувствительностью 65-87% и специфичностью 61,5-92,3%. Значимых различий цитокинов по этиологическому признаку не выявлено.

В результате исследования выявлены новые аспекты использования индексов APRI и MELD при ЦП вне зависимости от этиологического фактора, позволяющие дифференцировать классы тяжести ЦП.

Класс А диагностируют при индексе APRI менее 1,12. При значении APRI более 1,12 и менее или равном 1,78 устанавливают класс В, более 1,78 верифицируют декомпенсированную стадию цирроза – класс С с чувствительностью 89,7 - 90,9% и специфичностью 68,8 - 91,7%. APRI способен не только дифференцировать гепатит от цирроза, но и стратифицировать ЦП по классу тяжести. Индекс MELD позволяет не только выявлять декомпенсированную стадию, но и дифференцировать класс А и класс В ЦП с чувствительностью 73,3% и специфичностью 84,6%.

Глава 5. ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ПАТОГЕНИ- ТИЧЕСКИХ ЗНАЧИМЫХ МОЛЕКУЛ

Молекулярно-генетическое исследование было проведено у лиц, проживающих в Пермском крае. Мы проанализировали однонуклеотидные замены в генах IL-6, TNF, и VEGF. В качестве контрольной группы было проведено тестирование у 80 условно здоровых лиц без хронических заболеваний печени .

При этом поставили следующие задачи:

1. Провести анализ частоты встречаемости генотипов исследуемых генов в группах здоровых лиц и больных ЦП.
2. Выполнить генетическое тестирование в различных группах, сформированных по полу пациента, этиологии и степени тяжести.
3. Изучить сочетанное влияние полиморфизма изучаемых генов на развитие прогрессирование цирроза печени различной этиологии.

5.1. Анализ полиморфизма генотипов исследуемых генов

Анализ результатов изучения полиморфизма генов цитокинов TNF- α , IL-6 и VEGF позволил установить, что полиморфизм гена иммунного ответа и апоптоза (TNF- α) в группе больных ЦП встречался в 1,5 раза реже ($\chi^2=4,22$; $p=0,04$) по сравнению с группой сравнения. При этом гетерозигота GA и минорная аллель A исследуемого гена у пациентов с ЦП регистрировались несколько 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 (табл.24).

Полиморфизм гена интерлейкина-6 IL-6(C174G) отличался в группе больных ЦП от группы сравнения преимущественной распространенностью ге-

на в гетерозиготном состоянии ($\chi^2=16,87$; $p<0,001$; $OR=4,31$) по общей модели наследования.

Таблица 24

Распределение частот генов – маркеров воспаления у пациентов с ЦП

Генотип/аллель		Группа сравнения,% (n)	Группа больных с ЦП	<i>p</i>
<i>TNF</i> (G4682A) rs1800629	GG	54,7 (43)	34,7 (16)	0,04
	GA	43,7 (35)	58,8 (27)	0,09
	AA	2,6 (2)	6,5 (3)	0,06
	G	75,6 (121)	64,2 (59)	0,2
	A	24,4 (39)	35,8 (33)	0,1
<i>IL-6</i> (C174G) rs1800795	CC	28,7 (23)	14,5 (10)	0,08
	CG	50 (40)	81,1 (56)	0,001
	GG	21,3 (17)	4,4 (3)	0,06
	C	75,6 (86)	64,2 (76)	0,6
	G	24,4 (74)	35,8 (62)	0,8
<i>VEGFA</i> (G-634C) rs2010963	GG	32,5 (26)	13,0 (6)	0,01
	GC	48,7 (39)	76 (35)	0,01
	CC	18,7 (15)	10,8 (5)	0,4
	G	56,8 (91)	51 (69)	0,3
	C	43,1 (47)	48,9 (61)	0,4

Статистически значимых различий в частоте встречаемости аллелей С и G в исследуемых когортах не было обнаружено ($p=0,8$).

При сравнении распространенности аллельных вариаций гена *VEGFA* (G-634C) в когорте больных ЦП доминантный генотип встречался значимо реже в 13,04% случаев ($\chi^2=9,21$; $p=0,01$; $OR=0,31$), чем в группе сравнения. Хотя гетерозиготный генотип GC преобладал в 76% у больных ЦП, чем в группе здоровых лиц – 48,7% ($\chi^2=9,21$; $p=0,01$; $OR=3,34$) по общей модели наследования.

Таким образом, у пациентов ЦП выявлены достоверные по отношению к группе сравнения изменения полиморфизма генов, кодирующих обозначенные цитокины, в виде повышенной распространенности гетерозиготного генотипа у пациентов Пермского края и имеет ассоциацию к развитию и формированию ЦП.

5.2. Распределение генотипов в зависимости от пола пациентов, этиологии и класса тяжести цирроза печени

В работе была проанализирована частота встречаемости полиморфизма генов фактора некроза опухоли- α по локусу (*G4682A*) и васкулоэндотелиального фактора роста в локусе (*G-634C*) у 22 (47,8%) мужчин и 24 (52,2%) женщин с ЦП. Мы не выявили ассоциации между вариантами полиморфных локусов генов *TNF* (*G4682A*) и *VEGFA* (*G-634C*) с полом больных ЦП (табл. 25).

Таблица 25

Частота встречаемости генотипов *TNF* (*G4682A*), *VEGFA* (*G-634C*) в зависимости от гендерного состава больных с ЦП

Генотип/аллели, %			Мужчины (n=22)	Женщины (n=24)	OR	χ^2	<i>p</i>
<i>TNF</i> (<i>G4682A</i>)	Генотип %	GG	31,88	37,5	0,76	0,03	0,6
		GA	63,63	54,15	1,46		
		AA	4,54	8,33	0,51		
	Аллели %	G	63,66	64,58	0,76	0,001	0,93
		A	36,36	35,42	1,04		
<i>VEGFA</i> (<i>G-634C</i>)	Генотип %	GG	9,09	16,67	0,50	1,05	0,41
		GC	81,82	70,83	1,85		
		CC	9,09	12,5	0,70		
	Аллели %	G	50	52,08	0,92	0,02	0,84
		C	50	47,92	1,09		

Примечание. χ^2 – сравнение частот генотипов и аллелей в группе с ЦП между женщинами и мужчинами; OR-отношение риска.

Полиморфизм C-174G гена *IL-6* имел статистически значимые различия по гендерному признаку. Частота доминантного генотипа CC чаще встречалась

у 24,24% мужчин, чем у женщин – в 5,56% ($\chi^2=4,85$; $p=0,03$; $OR=5,44$); генотип CG чаще была найдена у женщин в 91,67% случаев, чем у мужчин – в 69,7% ($\chi^2=5,60$; $p=0,03$; $OR=0,21$) встречалась у мужчин - в 46,51% по рецессивной модели наследования (рис.25).

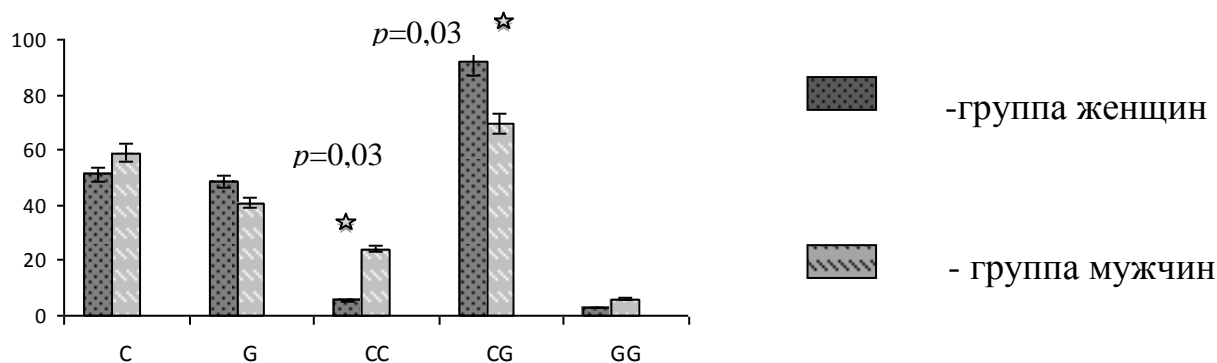


Рис. 25. Частота генотипа IL-6 (C174G) в группах мужчин и женщин с ЦП у лиц Пермского края

То есть, имеется ассоциация аллели G в виде генотипа CG гена *IL-6* (C174G) с женским полом.

У больных с ЦП вирусной этиологии доминантная гомозигота GG и аллель G в локусе (G4682A) гена *TNF-A* с высокой вероятностью ($OR=10,50$ и $OR=3,68$) были выявлены 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. Гомозигота AA и минорный аллель A в данном локусе гена исследуемого цитокина наоборот, были выявлены значимо чаще у больных ЦП алкогольной этиологии, чем у пациентов с ЦП вирусного генеза ($p<0,001$ и $p=0,01$ соответственно) (рис. 26).

Таким образом, выявлена ассоциация аллели A гена *TNF* в локусе (G4682A) с формированием алкогольного ЦП, как в виде носительства гетерозиготы GA, так и гомозиготы AA.

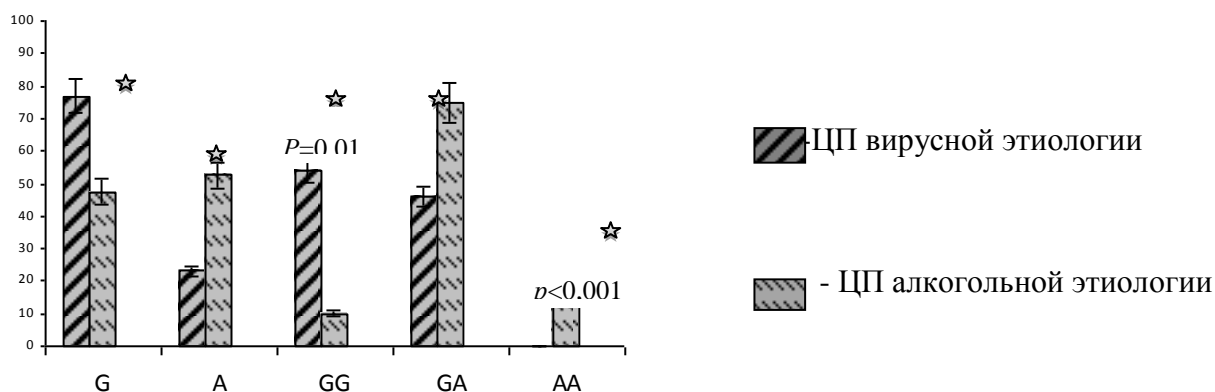


Рис. 26. Частота генотипа TNF (*G4682A*) в группах с ЦП вирусной и алкогольной этиологии.

При анализе частоты встречаемости полиморфизма гена *IL-6* (*C174G*) (см. рис. 27) у 23,81% больных вирусным ЦП выявлен генотип *CC*, при этом у пациентов с ЦП алкогольного генеза она отсутствовала ($\chi^2=4,07$; $p=0,001$).

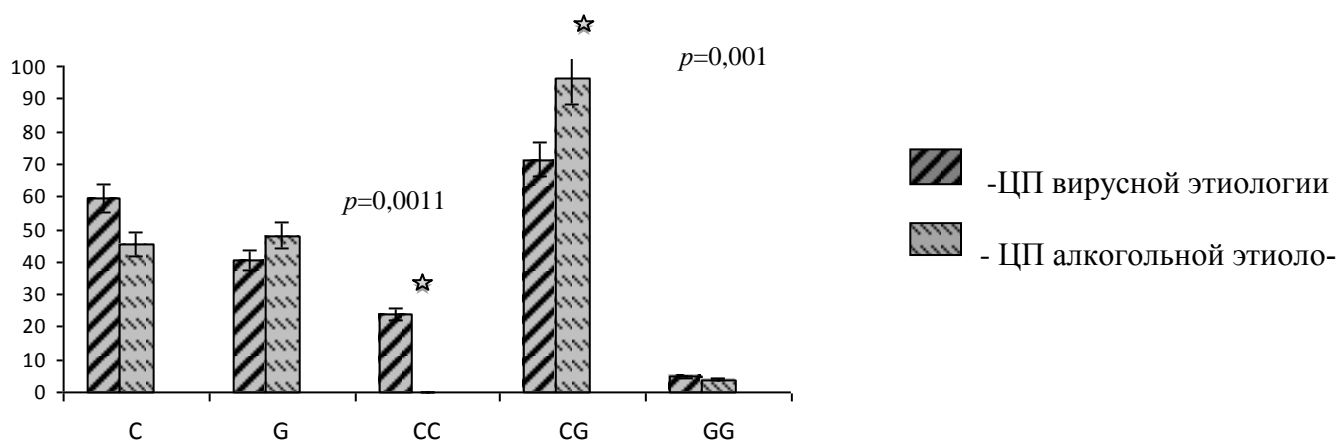


Рис. 27. Частота распределения генотипов и аллелей гена *IL-6* (*C174G*) в группах с ЦП вирусной и алкогольной этиологии у лиц Пермского края.

Генотип *CG* в данном локусе гена *IL-6* наоборот, была выявлен значительно чаще у 96,3% больных с алкогольным ЦП, чем у 71,43% пациентов с циррозом вирусной этиологии ($\chi^2=4,07$; $p=0,001$; $OR=2,17$).

Таким образом, имеется ассоциация аллеля *G* гена *IL-6* (*C174G*) с ЦП алкогольной этиологии преимущественно в виде носительства гетерозиготы *CG*.

Анализ частоты встречаемости полиморфизма гена *VEGFA* (G-634C) показал, что у больных с вирусным ЦП доминантная гомозигота GG была выявлена в 23,08% случаев, при этом у пациентов с ЦП алкогольного генеза она отсутствовала ($p=0,01$). Гетерозигота GC в данном локусе гена *VEGFA* наоборот, была выявлена значительно чаще у 95% больных с алкогольным ЦП, чем у 61,64% пациентов с вирусным циррозом ($p=0,01$) (рис. 28).

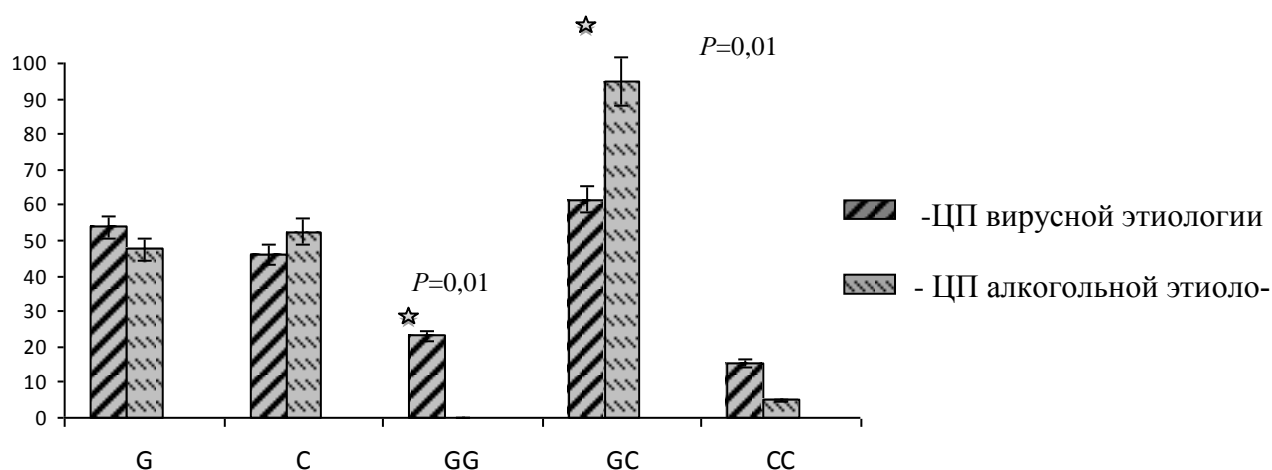


Рис. 28. Частота распределения аллельных пар гена *VEGFA* (G-634C) в группах с ЦП вирусной и алкогольной этиологии (*- различия статистически значимы).

Выявлена ассоциация аллеля C гена *VEGFA* (G-634C) с ЦП алкогольной этиологии преимущественно в виде носительства гетерозиготы GC.

При сравнении частоты встречаемости генотипов в зависимости от класса тяжести нами выявлено, что полиморфизм G-4682A гена *TNF* не имел значимых различий и генотипы GG и GA и AA встречались с одинаковой частотой ($p = 0,42$). Достоверных различий частоты встречаемости минорной аллели A также не было найдено ($\chi^2=1,02$; $p=0,63$; OR=0,81) (табл. 26). Полиморфизм – 174C/G гена *IL-6* при прогрессировании класса тяжести ЦП не имел достоверно значимых различий ($p > 0,05$). Так, частоты встречаемости аллеля G у пациентов 1 группы и 2 группы были равны 44,44 и 45,45% соответственно ($p=0,91$).

Аллель С у пациентов с классом А и классом В была обнаружена в 55,56% случаев, с классом С - в 54,55% ($p=0,91$).

Таблица 26

Частота встречаемости аллельных вариантов *TNF*(G4682A), *IL-6* (C174G) и *VEGFA* (G-634C) в зависимости от класса тяжести цирроза

Генотип/аллели, %			Класс А, В (n=28)	Класс С (n=18)	OR	χ^2	<i>p</i>
<i>TNF</i> (G4682A)	Генотип %	GG	39,29	27,78	1,68	1,07	0,42
		GA	53,57	66,67	0,58		
		AA	7,14	5,56	1,31		
	Аллели %	G	66,07	58,63	1,24	0,07	0,63
		A	33,93	41,37	0,81		
<i>IL-6</i> (C174 G)	Генотип %	CC	16,67	16,66	1,45	1,02	0,52
		CG	77,78	79,18	0,63		
		GG	5,56	4,16	1,88		
	Аллели %	C	55,56	54,55	1,04	0,00	0,91
		G	44,44	45,45	0,96		
<i>VEGFA</i> (G-634C)	Генотип %	GG	17,86	5,56	3,70	1,48	0,34
		GC	71,43	83,33	0,50		
		CC	10,71	11,11	0,96		
	Аллели %	G	53,57	47,22	1,29	0,35	0,56
		C	46,43	52,78	0,78		

Примечание: χ^2 – сравнение частот генотипов и аллелей в группе с ЦП в зависимости от степени тяжести; OR-отношение риска.

При анализе вариаций гена *VEGFA* (G-634C) в обеих группах генотипы GG и GC и CC встречались с одинаковой частотой, при этом достоверных различий найдено не было ($p=0,34$) (табл.26).

То есть, ассоциации между аллельными вариациями полиморфных локусов генов *TNF* (G4682A), *IL-6* (C174G) и *VEGFA* (G-634C) с темпами развития ЦП нами не выявлено.

5.3. Влияние генетических маркеров на риск развития цирроза печени

Для выявления ассоциации генетического риска развития цирроза печени нами была разработана шкала бальной оценки. По изучаемым генетическим маркерам мы присваивали баллы и сопоставляли их с этиологическим признаком: 0 баллов присваивали, если пациент имеет две гомозиготные протективные аллели по всем генам; 1 балл, если пациент гетерозиготен хотя бы по одному из изучаемых генов; 2 балла, если пациент гетерозиготен по двум генам из трех; 3 балла, если пациент гетерозиготен по всем генам; 4 балла, если пациент имеет хотя бы по одному гену обе аллели риска прогрессирования; 5 баллов по двум из трех имеет обе аллели риска; 6 баллов, если пациент имеет по всем генам обе аллели риска прогрессирования.

В группе с вирусным ЦП мы чаще выявили пациентов с 1 и 2 баллами (68,2%), то есть гетерозиготные по одному, либо двум генам из трех (табл. 27).

Таблица 27

Взаимосвязь полиморфизма изучаемых генов с этиологией цирроза печени

Баллы	0	1	2	3	4
ЦП вирусный, %	9,1	27,3	40,9	13,6	9,1
ЦП алкогольный, %	-	5	5	75	15

В группе с алкогольным циррозом в 75% случаев обнаруживались лица с баллом 3 и в 15% - с баллом 4, гетерозиготные по всем генам, либо имеющие

обе аллели риска по одному гену. При такой генетической комбинации у пациентов риск развития и формирования цирроза печени при воздействии алкогольного фактора возрастает.

При анализе частот генотипов по генам *TNF*(G4682A), *IL-6* (C174G) и *VEGFA* (G-634C) генетические комбинации в группах больных ЦП с функциональным классом А и В+С встречались примерно с одинаковой частотой статистически значимых различий не было выявлено (табл. 28).

Таблица 28

Взаимосвязь полиморфизма изучаемых генов у больных в зависимости от класса тяжести цирроза печени

Баллы	0	1	2	3	4
Класс А,%	5,9	5,9	23,5	41,2	23,5
Класс В+С,%	3,4	13,8	24,1	38	20,7

Однако при мультифакторном анализе выявлено наличие зависимости между изучаемыми качественными признаками и полиморфизмом гена *TNF* (G4682A) со снижением уровня общего белка ($p=0,016$) и гиперпродукцией АФП ($p=0,04$), полиморфизма гена *IL-6* (C174G) со снижением количества тромбоцитов ($p=0,04$), что свидетельствует о возможном влиянии изученных полиморфизмов на тяжесть поражения печени.

При анализе гена *VEGFA* в локусе G-634C наблюдалась взаимосвязь с увеличением выработки $TNF-\alpha$ ($p=0,04$) и АФП ($p=0,04$), что вероятно может влиять на активацию процессов воспаления и механизмов патологической регенерации в печени.

РЕЗЮМЕ

Выявлен генетический риск развития цирроза печени у лиц, проживающих в Пермском крае в зависимости от сочетанного влияния аллельных вариаций по генам *TNF*(G4682A), *IL-6* (C174G) и *VEGFA* (G-634C). Более значимый вклад риск алкогольного цирроза печени носит полиморфизм *TNF*(G4682A).

Ассоциации между генетическими маркерами с содержанием прогностически значимых цитокинов в сыворотке крови и классами тяжести прогрессирования ЦП нами не выявлено. Найдены взаимосвязи однонуклеотидных полиморфизмов патогеннетически значимых молекул с функциональными печеночными тестами, позволяют предположить влияние изученных полиморфизмов на тяжесть поражения печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цирроз печени, как исход многих хронических заболеваний печени, по-прежнему остается значимой социально-экономической и медицинской проблемой [3,5,6,11,16]. Распространенность основных этиологических факторов, таких как высокая алкоголизация населения и хронизация вирусных гепатитов, остается на высоком уровне [6,7,11,34]. Практически полное отсутствие клинических проявлений на ранних стадиях заболевания и многообразие клинико-лабораторных синдромов на стадии декомпенсации усложняют своевременную диагностику и выбор тактики введения пациентов [34]. В настоящее время множество работ, особенно в зарубежной литературе, посвящено изучению синдрома «цирроз-ассоциированной иммунной дисфункции», возникающий на последних стадиях цирроза печени как результат иммунной дисфункции и системного воспаления [106]. И недостаточно рассматривается роль воспаления в развитии цирроза печени, как ключевого показателя степени активности патологического процесса [19,21,24,25,52,63,86,106]. Изучение ряда цитокинов, как медиаторов воспаления, и патогенетически значимых молекул у пациентов с ЦП наравне с результатами общеклинических и лабораторных исследований является перспективным направлением для диагностики ЦП, особенно на ранних этапах [40,49,52]. Создание алгоритма лабораторных тестов, включающих в себя различные маркеры, с помощью которых можно дифференцировать стадии ЦП любой этиологии, является важной задачей [95,106].

Перечисленные причины определяют актуальность выполненной диссертационной работы по изучению влияния 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.

Для нашего исследования были включены пациенты с ЦП вирусной, алкогольной и смешанной этиологии, давшие согласие на участие в исследова-

нии, и прошедшие критерии отбора. Все пациенты были обследованы клиническими, лабораторными и инструментальными методами исследования.

Клинически у всех обследованных больных с ЦП отмечали синдромы: астеновегетативный, диспепсический, желтушный, воспалительный и портальной гипертензии. При этом, несмотря на схожесть процентного соотношения встречаемости синдромов, большая часть воспалительного и диспепсического синдромов отмечалась при алкогольном и смешанном циррозе, что еще раз подтверждает результаты других исследователей, доказывающих большую выраженность клинических параметров при алкогольном ЦП, чем при вирусном циррозе [13,25,38,39]. При ЦП смешанного генеза доля патологических клинических проявлений возрастала по сравнению с другими ЦП, что еще раз подтверждает пагубное сочетанное воздействие вирусной инфекции и алкоголя как гепатотоксичного фактора.

У половины больных «печеночные» знаки, кровотечения носовые, похудание, увеличение живота, асцит, как видно из таблицы, не регистрировались, что еще раз подтверждает субъективность клинических критериев, зависящих от многих факторов, что также отражено в научной литературе [3,4,13,25,38].

При объективном осмотре отмечали геморрагические проявления, увеличение печени и селезенки (55- 68%), желтушность склер и кожи (80%), отечность (76%). Наличие признаков нарушения сознания: снижение памяти и концентрации внимания, заторможенность ответов, тремор рук. Клинические признаки портальной гипертензии и клеточно-печеночной недостаточности выявлены у всех больных с разной степенью выраженности.

При сравнительном анализе синдромов по трем группам, связанных с функциональными классами тяжести по классификации Чайлд-Пью, нами выявлены закономерное прогрессирование патологического процесса, что обусловленного замкнутого порочного патогенетического круга. Классические признаки, характеризующие прогрессирование ЦП, нарастали и носили более выраженный характер. Болевой синдром усиливался, выраженность холестаза

проявлялась сильнее, нарушения печеночноклеточной недостаточности увеличивались, нарастала выраженность диспепсического синдрома и признаки внутрипеченочной портальной гипертензии. Переход цирроза в стадию декомпенсации, характеризующийся полиорганной недостаточностью, выражался яркой клинической картиной. При корреляционном анализе между функциональным классом тяжести заболевания и основными клиническими признаками выявлена сильная ассоциативная связь.

Таким образом, клинические проявления при циррозе печени имеют общие характерные особенности, независимо от этиологических различий. Прогрессирование цирроза проявляется в виде нарастания клинических проявлений, ухудшением состояния, присоединением осложнений и неблагоприятным исходом заболевания, что согласуется с общепринятым мнением [13,24,25,29,34].

По результатам лабораторных тестов у пациентов с ЦП по сравнению с группой контроля, все показатели были значительно выше, что свидетельствовало о выраженном цитолизе, холестазае, белковой недостаточности, мезенхиально-воспалительном синдроме, клеточно-печеночной недостаточности и патологической пролиферации в печени [3,4,8,10,17,25]. По этиологическому признаку статистически значимых результатов не выявили, тем самым доказывая схожесть клинико-лабораторных синдромов в различных этиологических группах, хотя имеются данные с противоречивыми результатами [13,34,72].

При сравнении сывороточной концентрации АФП уровень у больных вирусным ЦП ($p=0,03$) был достоверно выше, чем в группе с алкогольным ЦП. Значения АФП в группах пациентов в зависимости от вируса не имели достоверных различий.

По результатам стандартных лабораторных тестов при анализе значимости различий между группами пациентов по мере прогрессирования ЦП достоверно нарастала выраженность синдромов цитолиза по уровню АСТ ($p=0,03$),

холестаза по данным билирубина и его фракций ($p=0,02$ и $p=0,04$), ГГТП и ЩФ ($p=0,03$ и $p=0,03$), воспаления по С-реактивному белку и процентному содержанию γ -глобулинов ($p=0,02$ и $p=0,04$), печеночной недостаточности по уровню медианы общего белка ($p=0,04$) и альбумина ($p=0,03$), снижение протромбинового индекса и тромбоцитов ($p=0,01$ и $p=0,03$). Следует отметить, что уровень АЛТ и процентное содержание α - и β -глобулинов были существенно не изменены и не отличались результатами [3,4,8,10,17,25].

Уровень медианы АФП в сыворотке крови показал статистически значимый результат ($p=0,04$), что согласуется с полученными результатами других исследователей [42]. Повышенный уровень АФП в сыворотке крови увеличивался в зависимости от класса тяжести и имел статистически значимые показатели у пациентов с декомпенсированным ЦП. Медиана при классе тяжести А равнялась 4,41 (3,16 – 11,9) МЕ/мл, что было достоверно выше, чем в группах с другими классами тяжести заболевания ($p=0,01$ и $p=0,03$, соответственно у больных с классом В составил 2,85 (2,13 – 5,93), а у пациентов с классом А составил 2,39 (1,16-6,79) МЕ/мл.

Таким образом, определение сывороточного уровня АФП позволяет дифференцировать классы тяжести А и В от класса тяжести С, не зависимо от этиологии. Более высокий уровень АФП регистрируется у пациентов с ЦП смешанного генеза. По данным других исследователей выявлена значимая роль АФП в прогрессировании вирусного цирроза [57,58].

При корреляционном анализе в группе с ЦП обнаружены ожидаемые достоверные взаимосвязи класса тяжести заболевания с АСТ ($p=0,001$), фракциями билирубина, ЩФ ($p=0,04$), СРБ ($p=0,001$), γ -глобулином ($p=0,02$), а также обратные взаимосвязи с концентрацией общего белка ($p=0,03$) и альбумина ($p<0,001$).

Таким образом, маркеры цитолиза, холестаза, воспаления, гемостаза и белковые фракции отражают процессы прогрессирования ЦП независимо от этиологического фактора, что подтверждается их корреляциями с классом тяжести заболевания, что сходится с общепринятым мнением [3,4,8,10,17,25].

Сравнительный анализ лабораторных тестов при вирусном циррозе печени на фоне гепатитов В, С и микст-гепатитов показал сопоставимые результаты. У всех пациентов отмечено снижение уровня альбумина, повышение тимоловой пробы и СРБ и повышение глобулиновых фракций в сыворотке крови, что связано с воспалительными процессами и печеночно-клеточной недостаточностью [25].

Таким образом, ЦП в исходе ХГВ, ХГС и микст-гепатитов сопровождаются сопоставимыми по выраженности процессами патологической регенерации в печени, что может быть полезно при подходе в выборе тактики введения пациентов [25].

Процесс воспаления в печени является нормальной ответной реакцией на патогенные молекулы. Но длительное поражение ткани приводит к патологическим процессам, связанным с вовлечением в процесс патогенетически значимых молекул и свободных радикалов, увеличивающих выход клеточных элементов, приводящих к неконтролируемому делению, повреждающих ткань [32,33,37,52,72,83,122].

Ключевая роль цитокинов в патогенезе различных заболеваний, как медиаторов воспаления, установлена многочисленными авторами [2,4,21,30,43,46,52,53,58,61,64]. На сегодняшний день накоплено много данных, подтверждающих их значение в патогенезе цирроза, но в некоторых случаях отмечается разрозненность и неточность результатов, что может быть связано с различием методов и объектов наблюдений [32,72,83,92].

В ходе нашего исследования были определены концентрации нескольких цитокинов: TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-4, IFN- γ , VEGF и G-CSF. Из них достоверные результаты различия были получены для TNF- α в 3,6 раза ($p=0,001$) и IL-6 в 36,0 раза ($p<0,001$), VEGF 2,5 раза ($p<0,001$) и G-CSF в 1,3 раза ($p=0,01$). Уровень концентрации IL-1 β , IL-4 и IFN- γ у пациентов ЦП в сравнении со здоровыми пациентами не отличался, хотя у отдельных больных отмечали повышение показателей.

При сравнительном анализе концентрации цитокинов между группами циррозов печени различной этиологии расхождений не выявлено, что сходится с результатами других авторов [53,61,71,83,92]. Нами были выявлены взаимосвязи цитокинов между собой и со всеми значимыми лабораторными показателями, а также взаимосвязь IL-6 и VEGF с индексом APRI. При этом взаимосвязь IL-6 с СРБ демонстрировала умеренную корреляцию и обратную корреляцию с альбумином, что объясняется участием цитокина в выработке острофазовых белков и снижением синтеза альбумина на фоне воспаления. Умеренная корреляция фактора роста эндотелия и СРБ подтверждает взаимосвязь эндотелиальной дисфункции, неоангиогенеза на фоне воспалительного процесса в печени.

Таким образом, ЦП характеризуется высоким уровнем продукции VEGF, G-CSF и провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α . Полученные данные позволяют полагать, что высокие уровни VEGF, G-CSF, TNF- α и IL-6 отражают степень активации воспалительного ответа, что сходится с мнением других авторов [61,64,73,92,110]. При ЦП вне зависимости от этиологического фактора изменения цитокинового статуса сходны с преобладанием выработки провоспалительных цитокинов [58,61,92].

С целью изучения роли цитокинов в реализации воспалительного ответа нами были изучены взаимосвязи между их содержанием в сыворотке крови и классом тяжести заболевания. Полученные данные отражали выраженность

воспалительной реакции по мере прогрессирования ЦП. Уровень IL-6 у пациентов с субкомпенсированным ЦП (класс В) был выше в 3 раза, чем при компенсированной стадии ($p < 0,001$), а также имел достоверные различия у больных с декомпенсированным ЦП ($p < 0,001$), и уровень медианы вырос ещё в 3,2 раза. Концентрация VEGF в 3 раза повышалась на стадии тяжелого цирроза ($p < 0,001$). Концентрация G-CSF в 2,7 раза повышалась на классе тяжести С ($p = 0,04$), но в пределах референсных значений. Провоспалительный цитокин TNF- α значимо увеличивался при переходе в класс В ($p = 0,01$). Корреляционные взаимосвязи цитокинов IL-6, TNF- α с функциональными показателями отражают класс тяжести заболевания.

Таким образом, возможность цитокинов усиливать и поддерживать патологический процесс, запускать тканевой процесс регенерации ткани сопровождается гиперпродукцией провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- α и факторов роста, что указывает на активацию цитокиновой регуляции воспалительного процесса [61, 64,72,92].

Повышенные уровни цитокинов TNF- α , IL-6, VEGF и G-CSF способствуют усугублению и прогрессированию цирроза, а их сывороточные концентрации отражают уровень воспалительной реакции и степень повреждения органа. В пользу данного утверждения свидетельствуют выявленные корреляции изучаемых цитокинов с такими показателями класса тяжести заболевания, как маркеры цитолиза, холестаза, мезенхимально-воспалительного синдрома и печеночной недостаточности [4,18,72,92].

Результат сравнительного анализа цитокинового профиля у пациентов с вирусным ЦП в исходе В, С и микст-гепатитов показал, что концентрация цитокинов в сыворотке крови трех исследуемых групп больных с ЦП не имела достоверных различий, что может свидетельствовать о дисбалансе цитокиновой регуляции воспалительного процесса при ЦП [48,50,53].

Для оценки выживаемости пациентов, давно применяемые прогностические шкалы, дают возможность выделить пациентов с высоким риском декомпенсации [49]. При применении к нашим пациентам расчетные индексы APRI и MELD выявили повышенные значения показателей в сравнении с группой здоровых лиц ($p < 0,001$ и $p < 0,05$). Также выявлена прямая взаимосвязь с маркерами цитолиза и холестаза и обратная взаимосвязь индекса APRI с уровнем альбумина ($p = 0,001$), что свидетельствует о нарастании цитолиза, холестаза и снижении синтетической функции печени по мере прогрессирования ЦП [73,88,89].

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

Показатель расчетного индекса MELD в группе с ЦП составил 12 баллов (10–15), что позволило отнести наших пациентов в группу больных с высоким риском летальности. В ходе нашего исследования мы предложили использовать индекс не только для дифференциации декомпенсированной стадии, но и для стратификации по трем функциональным классам ЦП. Нами были получены результаты, позволяющие применить критерий для стратификаций других стадий.

Значения расчетного индекса APRI достоверно увеличивался с нарастанием класса тяжести ЦП и составил в группе с классом тяжести А – 0,79 (0,6–1,05), с классом В – 1,65 (1,13–2,2), с классом С – 2,5 (2,13–2,87). Найдена прямая взаимосвязь индекса APRI с классом тяжести ЦП по шкале Чайлд–Пью ($r_s = 0,71$; $p < 0,001$).

Таким образом, расчет данного индекса цирроза позволяет уточнить не только наличие ЦП, но и отражает тяжесть патологического процесса и прогрессирование поражения печени [74,89,90].

Значения расчетного индекса MELD имели значимое увеличение и составили при классе А 7,2 (6–9), классе В – 10 (8–11), а при классе С – 14 (12–18). Найдена прямая корреляция расчетного индекса MELD с классом тяжести ЦП ($r_s=0,64$; $p=0,005$ по критерию Спирмена).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что процессы развития цирроза взаимосвязаны с активацией механизмов фиброза, и патологической регенерации печени, имеют прямую взаимосвязь с клинико-лабораторными показателями, что согласуется с другими исследователями [57,73,81,84,85,118]. Повышенные уровни показателей APRI, MELD и АФП с оценкой в динамике имеют диагностическую значимость для дифференциации класса тяжести заболевания ЦП вне зависимости от этиологического фактора.

Для оценки диагностической значимости данных маркеров IL-6, TNF- α , VEGF и G-CSF были построены графики ROC-кривых. Оценку графических моделей проводили по экспертной шкале значений площади под ROC-кривой: очень хорошее качество при доверительном интервале (ДИ) 0,8–0,9; хорошее качество 0,7–0,8; среднее качество 0,6–0,7; неудовлетворительное при 0,5–0,6.

При уровне TNF- α менее или равном 3 пг/мл диагностируют компенсированную (легкую) стадию ЦП, при концентрации IL-6 более 12,7 пг/мл и менее или равной 26,2 пг/мл, уровне TNF- α более 3 пг/мл устанавливают субкомпенсированную (класс В) стадию ЦП, а при значении IL-6 более 26,2 пг/мл, уровне VEGF более 169,4 пг/мл и концентрации G-CSF более 16,7 верифицируют декомпенсированную (класс С) стадию ЦП с чувствительностью 65–87% и специфичностью 61,5–92,3%.

При сравнении диагностической значимости наиболее информативными являются расчетный индекс APRI и IL-6, которые эффективно могут заменять комплекс параметров, входящих в классификацию Чайлд–Пью. Для скрининга ЦП наиболее полезен расчетный 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.

По результатам ROC-анализа, площадь под кривой индекса APRI для дифференциации класса тяжести ЦП составила AUC $0,927 \pm 0,05$ (доверительный интервал $0,81-0,98$), $p < 0,001$.

Индекс APRI менее 1,12 позволяет диагностировать класс А при ЦП с чувствительностью – 89,7% и специфичностью – 91,7%. При значении APRI более 1,12 и менее или равном 1,78 отражает класс В заболевания, более 1,78 – класс 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 [71].

Площадь ROC-кривой индекса MELD для дифференциации класса А и В от декомпенсации составила AUC $0,856 \pm 0,06$ (доверительный интервал $0,67-0,95$), $p < 0,001$.

Таким образом, индекс MELD позволяет дифференцировать классы тяжести А и В при ЦП (менее или равном 11) от класса С (более 11) с чувствительностью 73,3% и специфичностью 84,6%.

Полученные данные свидетельствуют, что процессы развития цирроза взаимосвязаны с активацией механизмов фиброза и имеют прямую взаимосвязь с клинико-лабораторными показателями. Повышенные уровни показателей APRI, MELD с оценкой в динамике имеют диагностическую значимость для

дифференциации класса тяжести заболевания ЦП вне зависимости от этиологического фактора.

С целью изучения ассоциации однонуклеотидных замен с риском развития цирроза печени нами был проанализирован полиморфизм генов фактора некроза опухоли-альфа TNF (*G4682A*), васкулоэндотелиального фактора роста VEGFA (*G-634C*) и интерлейкина-6 IL-6 (*C174G*) в группе больных с ЦП и здоровых лиц Пермского края.

По данным литературы полиморфный участок гена TNF- α в позиции – 238 и – 308 может влиять на активность ХГС [62], в других исследованиях наличие минорной аллели А связывают с повышенным риском рака печени [35,100].

В нашем исследовании мы проанализировали полиморфизм гена TNF (*G4682A*) у лиц вирусной и алкогольной этиологии и выявили с высокой вероятностью шансов более выраженную частоту встречаемости минорной гомозиготы AA и патологической аллели А в данном локусе гена исследуемого цитокина (10 и 47,5%) при $p < 0,001$ и $p = 0,01$ соответственно, в группе с алкогольным ЦП.

При изучении частоты распространенности генотипов и аллелей полиморфизма С–174G гена IL-6 у других авторов связано с повышенным уровнем одноименного цитокина [75,96]. Большинство работ посвящено изучению генотипа гена IL-6–174GC и –174CC с быстро прогрессирующим течением ХГС [1]. В других работах изучение однонуклеотидного полиморфизма гена С–174G гена IL-6 выполнено с целью выявления встречаемости ЦП алкогольного генеза [70].

В нашем исследовании были получены результаты для гетерозиготы CG, которая значимо чаще встречалась у 81,16% больных ЦП, чем в группе здоровых – 50% ($\chi^2 = 16,87$; $p < 0,001$; OR=4,31).

При сравнении встречаемости аллельных вариаций гена VEGFA (*G-634C*) в когорте здоровых лиц преобладал генотип GG в 32,5%, который у больных ЦП встречался значительно реже – в 13,04% случаев ($\chi^2=9,21$; $p=0,01$; OR=0,31). При этом гетерозигота GC достоверно чаще (в 76,09%) встречалась у больных ЦП, чем в группе здоровых – 48,75% ($\chi^2=9,21$; $p=0,01$; OR=3,34) по общей модели наследования, что указывает на ассоциацию риска с ЦП, хотя у других авторов результаты противоречивы [56].

Таким образом, выявлена ассоциация аллеля A гена TNF в локусе (*G4682A*) с ЦП алкогольного генеза в виде носительства гомозиготы AA, имеющая высокий риск развития цирроза. В плане прогнозирования предрасположенности к развитию риска ЦП значимо носительство гетерозиготы GA гена TNF, CG гена IL-6 и гетерозиготы GC гена VEGF. При изучении распределения аллельных вариантов исследуемых генов в группах больных ЦП в зависимости от тяжести течения достоверных различий найдено не было.

Для прогнозирования генетического риска развития цирроза в зависимости от аллельных вариаций по генам TNF(*G4682A*), IL-6 (*C174G*) и VEGFA (*G-634C*) была разработана шкала балльной оценки. С ее помощью проведена оценка патогенетически значимых молекул с вероятностью развития заболевания.

Полученные данные позволяют полагать, что формирование вирусного ЦП не имеет ассоциации с сочетанным влиянием генов, так как чаще выявлялись пациенты с 1 и 2 баллами (68,2%), то есть гетерозиготные по одному либо двум генам из трех. Однако в группе с алкогольным циррозом в 75% случаев обнаруживались лица с баллом 3 и в 15% – с баллом 4, гетерозиготные по всем генам либо имеющие обе аллели риска по одному гену.

Таким образом, нами было показано, что генетический полиморфизм является одним из факторов, определяющих риск развития алкогольного цирроза печени.

При анализе взаимосвязи между функциональным классом А и В+С и частотой встречаемости распространенности аллельных вариантов нами выявлено, что генетические комбинации встречались в группах больных циррозом примерно с одинаковой частотой. Можно предположить, что полиморфизм изучаемых генов не оказывает значимого влияния на прогрессирование ЦП.

Однако при корреляционном многофакторном анализе наличия зависимости между изучаемыми качественными признаками и функциональными тестами, которое проводилось по таблице сопряженности (кросстабуляции), 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[99].

Данные по анализу полиморфизма гена VEGF довольно разрозненны, не все однонуклеотидные замены в нетранслируемых регионах генов функционально значимы. Для полиморфизма в позиции -634G/C (rs2010963) промоторного гена VEGF некоторыми исследователями установлено влияние на экспрессию гена и ассоциация аллели -634C с высоким уровнем экспрессии VEGF [17].

Полиморфизм гена VEGF в локусе G-634C имел взаимосвязь с увеличением выработки TNF- α ($p=0,04$) и АФП ($p=0,04$), что, вероятно, может влиять на активацию процессов воспаления и механизмов патологической регенерации в печени [99].

Нами выявлено, что повышенный риск возникновения ЦП определяется полиморфизмом генов фактора некроза опухоли-альфа TNF (G4682A), интерлейкина-6 IL -6 (C174G) и васкулоэндотелиального фактора роста VEGF (G-634C). Носительство гетеро-гомозиготного генотипа G-4682A гена TNF имеет ассоциацию с высоким риском развития алкогольного цирроза.

На основании всего вышеизложенного, мы предлагаем алгоритм лабораторных тестов, который позволит оценить класс тяжести ЦП и наличие полиморфизма генов патогенетически значимых цитокинов .

1. Диагностика стадии ЦП:

- применение шкалы Чайлд-Пью

- расчет индекса цирроза с использованием не прямых маркеров по формуле: $APRI = (ACT / (\text{верхний предел } ACT)) \times 100 / \text{тромбоциты (109/л)}$. При значении индекса до 1,12 включительно диагностируют компенсированную (легкую) стадию ЦП, индекс APRI в интервале от 1,12 до 1,78 включительно соответствует субкомпенсированной (умеренной) стадии ЦП, индекс более 1,78 верифицирует декомпенсированный (тяжелый) ЦП;

- расчет индекса MELD с использованием не прямых маркеров по формуле: $APRI = 11,2 \times \ln(\text{МНО}) + 9,57 \times \ln(\text{креатинин, мг/дл}) + 3,78 \times \ln(\text{билирубин, мг/дл}) + 6,43$. При значении индекса до 11 включительно диагностируют компенсированную (легкую) и субкомпенсированную (умеренную) стадии ЦП, индекс MELD более 11 верифицирует декомпенсированный (тяжелый) ЦП;

- определение сывороточных концентраций IL-6, TNF- α , VEGF и G-CSF.

При значении в сыворотке крови IL-6 менее или равном 12,7 пг/мл, уровне TNF- α менее или равном 3 пг/мл диагностируют класс А, при концентрации IL-6 более 12,7 пг/мл и менее или равной 26,2 пг/мл, уровне TNF- α более 3 пг/мл устанавливают класс В, а при значении IL-6 более 26,2 пг/мл, уровне VEGF более 169,4 пг/мл и концентрации G-CSF более 16,7 верифицируют класс С.

- определение сывороточной концентрации АФП.

При значении уровня АФП в сыворотке крови менее 4,41 МЕ/мл диагностируют компенсированный и субкомпенсированный ЦП, более 4,41 диагностируют стадию декомпенсации.

2. Определение генетического риска формирования цирроза печени:

- определение генотипов генов TNF (*G4682A*) и VEGFA (*G-634C*) и IL-6(*C174G*), ассоциированных с развитием ЦП.

- определение генотипа *G4682A* гена TNF и выявление патологической аллели риска А, ассоциированной с развитием алкогольного ЦП: аллель -4682А гена TNF.

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 (интерлейкина-6, фактора некроза опухоли-альфа), факторов роста (васкулоэндотелиального фактора роста, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора) и маркера патологической регенерации печени (альфафетопротеина), 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.

При значении в сыворотке крови IL-6 менее или равном 12,7 пг/мл, уровне TNF- α менее или равном 3 пг/мл диагностируют класс А, при концентрации IL-6 более 12,7 пг/мл и менее или равной 26,2 пг/мл, уровне TNF- α более 3 пг/мл устанавливают класс В, а при значении IL-6 более 26,2 пг/мл, уровне VEGF более 169,4 пг/мл и концентрации G-CSF более 16,7 верифицируют класс тяжести С у больных с циррозом печени. Уровень АФП в крови менее 4,41 МЕ/мл позволяет стратифицировать компенсированный и субкомпенсированный цирроз (классы А и В) от декомпенсации (класс тяжести С) при показателе более 4,41 МЕ/мл.

4. У пациентов с циррозом печени расчетные индексы APRI и MELD позволяют дифференцировать классы тяжести заболевания независимо от этиологии процесса.

При значении индекса APRI до 1,12 включительно диагностируют класс тяжести А цирроза печени, индекс APRI в интервале от 1,12 до 1,78 включительно соответствует классу В, индекс более 1,78 верифицирует декомпенсированный класс тяжести С. Значение индекса MELD до 11 включительно диагностируют классы тяжести А и В, показатель более 11 верифицирует декомпенсированный класс тяжести С у больных циррозом печени.

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 А 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 ИЛ-6 менее или равном 12,7 пг/мл, уровне TNF- α менее или равном 3 пг/мл. Класс В устанавливается при концентрации ИЛ-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 ИЛ-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.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Диапазон референсных значений лабораторных показателей

Таблица 1

Тест	Единица измерения	Диапазон величин	Прибор
АЛТ	Е/л	0-55	Architect 4000
АСТ	Е/л	5-34	Architect 4000
ГГТП	Е/л	0-32	LW C 200i
ЩФ	Е/л	50-220	Architect 4000
Билирубин/ Билир. Пр.	мкмоль/л	3,4-20,5/ 0-8,6	Architect 4000
Общий белок	г/л	65-83	Architect 4000
Альбумин	г/л	35-52	LW C 200i
Тимоловую пробу	Ед	0-4	КФК-2
СРБ	мг/л	0-6	Architect 4000

Таблица 2

Тест	Единица измерения	Диапазон величин	Прибор
Альбумины	%	46,9-61,4	УЭФ «Астра»
α -1-глобулины	%	2,2-4,2	
α -2-глобулины	%	7,9-10,9	
β -глобулины	%	10,2-18,3	
γ -глобулины	%	17,6-25,4	

Аналитические и диагностические характеристики наборов

Таблица 3

Цитокин	Набор	ДЧ МЕ/мл не более	№ по каталогу	Нормы пг/мл	Диапазон измерений пг/мл
TNF- α	Альфа-ФНО- ИФА-БЕСТ	2	A-8756	0-6	0-250
IL-1 β	Интерлейкин-1 β ИФА-БЕСТ	1	A-8766	0-11	0-250
IL-4	Интерлейкин-4 ИФА-БЕСТ	2	A-8754	0-4	0-100
IL-6	Интерлейкин-6 ИФА-БЕСТ	0,5	A-8768	0-10	0-300
IFN- γ	Интерферон- γ ИФА-БЕСТ	5	A-8752	0-10	0-1000
VEGF	VEGF-ИФА БЕСТ	10	A-8784	10-246	0-2000
G-CSF	G-CSF-ИФА БЕСТ	2	A-8786	0-40	0-500

Протокол амплификации

1	95,0	C for 3:00
2	95,0	C for 0:15
3	63,0	C for 0:40 + Plate Read
4	GOTO 2	, 40 more times
END		

Рис. 1. Протокол амплификации

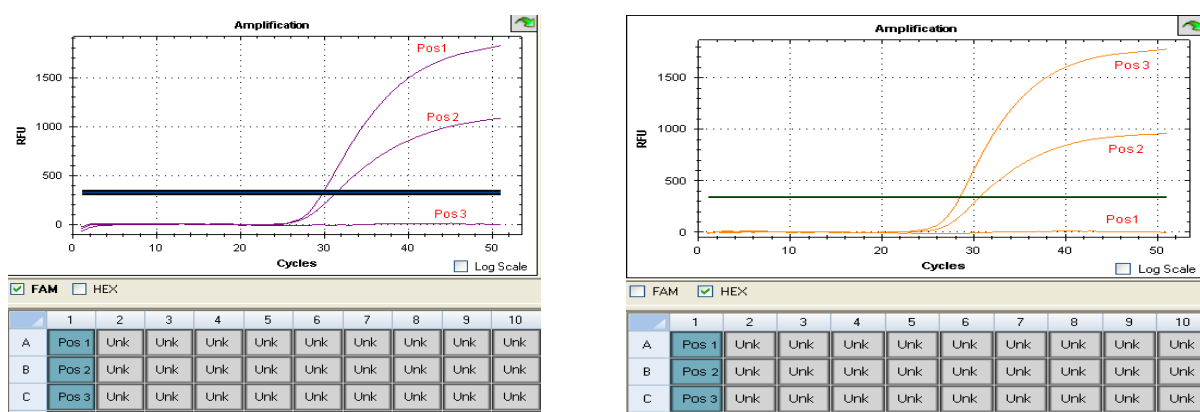


Рис. 2. Регистрация сигнала флуоресценции по каналам FAM и HEX.

Последовательность праймеров для определения полиморфизма генов

Таблица 4

Генотип	Номер	Последовательность праймеров
4682G>A гена TNF	rs 1800629	5'-agg-ttt-tga-ggg-gca-tg- ³ 5'-gga-cgg-ggt-tca-gc- ³
G634C гена VEGFA	rs 20109063	5'-cgt-gcg-agc-agc-gaa-ag- ³ 5'-gac-agg-ggc-aaa-gtg- ³
C174G гена IL6	rs 1800795	5'-ttg-tca-aga-cat-gcc-aaa-gtc- ³ 5'-tca-gac-atc-tcc-agt-cct-ata- ³

Пример интерпретации результатов при определении полиморфизма IL6_C174G (rs1800795)

Таблица 5

Allele 1 (FAM)	аллель С	Генотип С/С
Heterozygote (FAM+HEX)	аллель С+ аллель G	Генотип С/G
Allele 2 (HEX)	аллель G	Генотип G/G

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Параметры оценки диагностической ценности лабораторных тестов

Таблица 6

Параметры	Пациенты с циррозом печени	Здоровые пациенты
Результат положительный	A – истинно-положительные результаты у лиц с ЦП	B – ложно-положительные результаты у здоровых лиц
Результат отрицательный	C – ложно-отрицательные результаты у лиц с ЦП	D – истинно-отрицательные результаты у здоровых лиц
ДЧ (чувствительность)	$A / (A+C)$	
ДС (специфичность)	$D / (B + D)$	
ДЭ (эффективность)	$(A + D) / (A+B+C+D)$	

Формула 1

Индекс Юдена $J = \text{макс. (ДЧ + ДС - 1)}$

**Результаты статистической обработки ассоциации полиморфизма
гена с одноимёнными цитокинами**

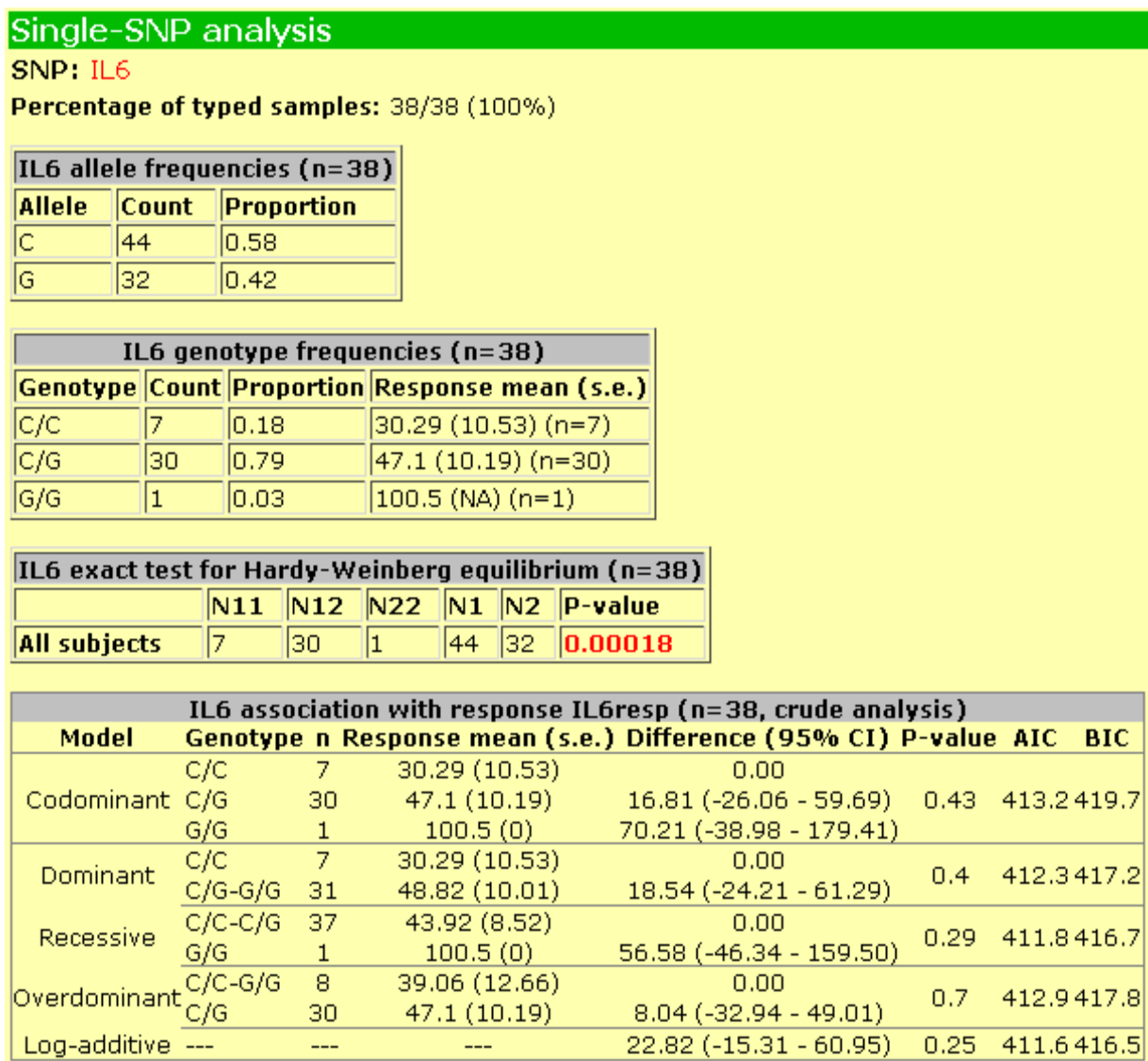


Рис.1. Результаты типирования и статистической обработки гена IL6 и его ассоциаций с содержанием одноименного цитокина.

SNP: TNF

Percentage of typed samples: 38/38 (100%)

TNF allele frequencies (n=38)

Allele	Count	Proportion
G	48	0.63
A	28	0.37

TNF genotype frequencies (n=38)

Genotype	Count	Proportion	Response mean (s.e.)
A/A	2	0.05	1.95 (1.95) (n=2)
G/A	24	0.63	5.19 (1.27) (n=24)
G/G	12	0.32	3.62 (0.35) (n=12)

TNF exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=38)

	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	12	24	2	48	28	0.042

TNF association with response TNFresp (n=38, crude analysis)

Model	Genotype	n	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	12	3.62 (0.35)	0.00			
	G/A	24	5.19 (1.27)	1.56 (-1.98 - 5.10)	0.53	236.7	243.3
	A/A	2	1.95 (1.95)	-1.67 (-9.33 - 5.98)			
Dominant	G/G	12	3.62 (0.35)	0.00			
	G/A-A/A	26	4.94 (1.19)	1.31 (-2.17 - 4.80)	0.46	235.5	240.4
Recessive	G/G-G/A	36	4.67 (0.86)	0.00			
	A/A	2	1.95 (1.95)	-2.72 (-9.97 - 4.54)	0.47	235.5	240.4
Overdominant	G/G-A/A	14	3.39 (0.39)	0.00			
	G/A	24	5.19 (1.27)	1.80 (-1.53 - 5.13)	0.3	234.9	239.8
Log-additive	---	---	---	0.50 (-2.48 - 3.47)	0.75	236	240.9

Рис.2. Результаты типирования и статобработки гена TNFR и его ассоциаций с содержанием одноименного цитокина

Descriptive statistics

Response variable: **VEGFresp** Type: quantitative

n	missing	unique	mean	.05	.10	.25	.50	.75	.90	.95
46	6	41	NA	34.78	49.3	109.05	203.55	420.9	777.57	990.4

lowest: 3.4, 34.5, 34.8, 35.8, 50.8 highest: 830.4, 830.4, 988, 1036, 1082

Covariate: **Gender** Type: categorical

	n	missing	unique	Response mean (s.e.)
All subjects	46	0	2	314.5 (47.21)
Fem	24	---	---	305.37 (61.47)
Mal	22	---	---	323.62 (73.22)

Single-SNP analysis

SNP: **VEGF**

Percentage of typed samples: 46/46 (100%)

VEGF allele frequencies (n=46)		
Allele	Count	Proportion
G	49	0.53
C	43	0.47

VEGF genotype frequencies (n=46)			
Genotype	Count	Proportion	Response mean (s.e.)
C/C	4	0.09	332.47 (219.3) (n=3)
G/C	35	0.76	292.77 (48.47) (n=31)
G/G	7	0.15	417.73 (124.83) (n=6)

VEGF exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=46)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	7	35	4	49	43	0.00084

VEGF association with response VEGFresp (n=46, adjusted by Gender)							
Model	Genotype	n	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	6	417.73 (134.83)	0.00			
	G/C	31	292.77 (51.5)	-142.12 (-420.39 - 136.15)	0.61	577.3585.7	
	C/C	3	332.47 (253.23)	-107.75 (-543.71 - 328.21)			
Dominant	G/G	6	417.73 (134.83)	0.00	0.32	575.3582.1	
	G/C-C/C	34	296.28 (50.45)	-139.56 (-412.87 - 133.75)			
Recessive	G/G-G/C	37	313.04 (48.17)	0.00	0.93	576.4583.1	
	C/C	3	332.47 (253.23)	16.29 (-345.78 - 378.35)			
Overdominant	G/G-C/C	9	389.31 (114.55)	0.00	0.38	575.5582.3	
	G/C	31	292.77 (51.5)	-103.81 (-332.51 - 124.88)			
Log-additive	---	---	---	-74.99 (-283.94 - 133.96)	0.49	575.8582.6	

Рис. 3. Результаты типирования гена VEGF и его ассоциаций с содержанием эндотелиального фактора роста

Таблица кросстабуляции ПЛ-6 с клиническими симптомами ЦП

Кросстабуля- ция	Кі =	ХИ- К В=	эм- пи р.	крит. р=0,05	УРОВЕНЬ ЗНА- ЧИМОСТИ	
			знач.		р (альфа)	п' (DF)
55	0,607	6,786	6,0	0,034	2	
0	1	<i>Итого</i>				
8	0	8				
33,3	0,0	26,7				
100,0	0,0	100,0				
12	2	14		ПЛ-6		
50,0	33,3	46,7				
85,7	14,3	100,0				
4	4	8				
16,7	66,7	26,7				
50,0	50,0	100,0				
24	6	30				
100,0	100,0	100,0				
80,0	20,0	100,0				

**Диагностические характеристики и стоимость тестов диагностики
цирроза печени**

Тесты	ДЧ,%	ДС,%	Стоимость, руб
Чайлд-Пью	74	74	Билирубин-120 Альбумин- 100 Протромбин- 110 Итого - 330
APRI	89,7	91,7	АСТ-100 Тромбоциты- 80 Итого – 180
MELD	74	58	МНО- 140 Билирубин- 120 Креатинин- 100 Итого - 360
IL-6	85,7	87,3	260
TNF-a	65	76	260
VEGF	70	92	260
G-CSF	75	61	260

Примечание: ДЧ – диагностическая чувствительность; ДС – диагностическая специфичность

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаев, С.М. Генетические факторы агрессивного течения хронического гепатита С/ С.М.Абдуллаев, Ю.И.Целищева, Л.М.Самоходская, В.В.Квасовка, Т.М. Игнатова, Т.Н.Краснова, В.П.Бочкова, Н.А.Мухина// Вестник Российской академии медицинских наук. – 2007. – №1. – С.8 – 13.
2. Базарный, В.В. Диагностическое значение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при циррозе печени /В.В. Базарный, Н.В. Гаренских // Новости «Вектор-Бест». – 2013. – № 2 (68). – С.12 – 14.
3. Базарный, В.В. Проблемы лабораторной диагностики цирроза печени/ В.В.Базарный, Н.В.Гаренских// Новости «Вектор-Бест». – 2013. – №1(67). – С.9 – 11.
4. Базарный, В.В. Суррогатные лабораторные тесты в оценке фиброза при циррозе печени / В.В. Базарный, Н.В. Гаренских, О.В. Косарева //Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №9. – Ч.9. – С.118 – 119.
5. Бакулин, И.Г. Лечение больных с циррозом печени HBV-этиологии: успехи, нерешенные вопросы/ И.Г. Бакулин, Т.Ю. Хайменова, И.О. Сидорова// Терапевтический архив. – 2013. – №12. – С.120 – 124.
6. Бакулин, И.Г. Цирроз печени: что нового в лечении/ И.Г.Бакулин, Ю.Г Сандлер//Эффективная фармакология. – 2014. – №43. – С.42 – 50.
7. Барамзина, С.В. Клинико-эпидемиологическая и молекулярно-генетическая характеристика гепатита С у больных, проживающих на Севере Волго-Вятского региона/С.В. Барамзина// Медицинский альманах. – 2013. – №2(26). – С. 83 – 86.
8. Белобородова, Э.И. Способ оценки функционального состояния печени у больных хроническим гепатитом и циррозом печени/Э.И. Белобородова, М.Н.Шписман, Р.О. Гайсаев, И.Б. Каблукова//Патент. RU 2194280. БИ №34. Дата публикации 10.12.2002г.

9. Белякин, С.А. Взаимозависимость употребления алкоголя и смертность от цирроза печени/С.А.Белякин, А.Н. Бобров, С.В. Плюснин //Военно-медицинский журнал. – 2009. – №9 (330). – С.48 – 54.
- 10.Бессонова, Е.Н. Современные возможности оценки тяжести состояния и прогноза жизни больных циррозом печени в терминальной стадии/Е.Н.Бессонова, К.Ю.Кокина//Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2012. – №5. – С.19 – 25.
- 11.Бобров, А.Н. Этиологическая структура циррозов печени по результатам пятнадцатилетнего наблюдения /А.Н. Бобров, С.А. Белякин, С.В. Плюснин //Вест. Рос.воен.-мед.академии. – 2011. – №1(33). – С.76 – 80.
12. Бодиенкова, Г.М. Роль полиморфизма и экспрессии отдельных генов цитокинов в формировании патологии / Г.М. Бодиенкова, Ж.В.Титова // Успехи современного естествознания. – 2015. – №1. – С.616 – 620.
13. Бондарева, К.С.Клиническая характеристика хронического гепатита и цирроза печени различной этиологии / К.С.Бондарева, П.В.Лебедев// Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – №5(140). – С. 46 – 51.
- 14.Боженко, Е.Н. Гендерные особенности цирроза печени /Е.Н.Божко, Д.А.Хомич, М.Ю. Сурмач, Н.И.Прокопчик//Журнал ГрГму. – 2013. – №3. – С.36 – 38.
- 15.Власов, В.В. Введение в доказательную медицину. – 1988. – 392 с.
- 16.Всемирная организация здравоохранения / Электронный ресурс: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/ru>: Информационный бюллетень. Дата обращения 21.08.2017.
17. Вялов,С.С. Скрининговые методы выявления фиброза печени/ С.С.Вялов//Архивъ внутренней медицины. – 2012. – №3(5). – С.48 – 57.

18. Гарбузенко, Д.В. Неинвазивные методы портальной гипертензии у больных циррозом печени/Д.В. Гарбузенко// Гастроэнтерология. – 2015. – Спец.вып. №2 – С.33 – 39.
19. Гончарова, И.А. Полиморфизм генов-модификаторов иммунного ответа при заболеваниях печени различной этиологии / И.А.Гончарова [и др.] // Медицинская генетика. – 2010. – №12. – С.20 – 24.
20. Горецкая М.В. Роль нейтрофилов, лимфоцитов, клеток Ито, купферовских, дендритных и синусоидальных эндотелиальных клеток в печени/М.В.Горецкая//Журнал ГрГМУ. – 2008. – №1. – С.28 – 34.
21. Гусев, Е.Ю. Варианты развития хронического системного воспаления/ Е.Ю.Гусев, В.А.Черешнев, Ю.А.Журавлева, Л.В. Соломатина, Т.Э.Зубова//Медицинская иммунология. – 2009. – №2–3(11). – С. 131 – 140.
22. Гусев, Е.Ю. С-реактивный белок: патогенетическое и диагностическое значение/ Е.Ю. Гусев// Уральский медицинский журнал. – 2014. – №1(115). – С.113 – 119.
23. Дудина, К.Р. Хроническая HBV-инфекция: молекулярно-генетические методы диагностики, оптимизирующие тактику ведения пациентов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.09 / Дудина Ксения Рудольфовна. – М., 2011. – 42 с.
24. Дядык, А.И. Симпозиум «Цирроз печени»/ А.И. Дядык, А.Э.Багрий, И.И. Вишневский, В.Б. Гнилицкая, М.В. Хоменко// Новости медицины и фармации. – 2013. – №5(449).
25. Ивашкин, В. Т. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации по лечению осложнений цирроза печени. В.Т.Ивашкин, М.В.Маевская, Ч.С.Павлов, Е.А.Федосьина, Е.Н.Бессонова, И.Ю.Пирогова, Д.В.Гарбузенко // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2016. – Т. 26. – № 4. – С. 71 – 100.

26. Комова, А.Г. Принципы эффективной диагностики диффузных заболеваний печени на амбулаторном этапе/ А.Г.Комова, М.В.Маевская, В.Т.Ивашкин//Рос.журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2014. – №6(24). – С.36 – 41.
27. Коротчаева, Ю.В. Прогностическое значение определения ИЛ-6 в сыворотке крови и цитохрома Р 450 в ткани печени у больных хроническим гепатитом С/Ю.В. Коротчаева, Л.М. Самоходская, А.И. Сперанский, Л.В. Козловская, Н.Б. Гордовская, А.В. Павленко, Н.А. Мухин, В.А. Ткачук //РЖГГК. – 2008. – Т.18. – №2. – С.42 – 47.
28. Крутиков,С.Н. Характерные особенности изменений некоторых показателей воспаления и неспецифического иммунитета при бактеримии у больных циррозом печени/ С.Н.Крутиков, А.А.Хренов, М.С. Крутикова, О.Н.Постникова, Ю.Л. Криворутченко// Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2011. – №2. – С.37 – 40.
29. Кучерявый, Ю.А. Хронический гепатит, цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома-звенья одной цепи/Ю.А. Кучерявый, Н.Ю. Стукова, М.Л.Ахтаева//Клинические перспективы гастроэнтерологии и гепатологии – 2012. – №5. – С.3 – 12.
30. Левитан, Б.Н. Фактор некроза опухоли и его растворимые рецепторы при хронических гепатитах и циррозах печени/ Б.Н.Левитан, А.В.Астахин, Г.Б.Левитан//Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – №2(138). – С.62 – 66.
31. Лызиков, А.Н. Значение методов визуализационной диагностики цирроза печени и портальной гипертензии/А.Н.Лызиков, А.Г.Скуратов, Ю.П. Шпаковский//Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – №2(48). – С. 21 – 25.
32. Маянский, Д.Н. К 75-летию со дня рождения (публикация, посвященная памяти Д.Н. Маянского). Цирроз печени глазами патофизиолога / Д.Н.Маянский // Практическая медицина. – 2012. – №6(61). – С.82 – 85.

33. Мироджев, Г.К. Интерлейкин-6 и оксид азота в патогенезе портальной гипертензии и декомпенсации цирроза печени / Г.К. Мироджаев, С.А.Авезов, М.М.Гиясов, З.М.Абдуллаева // Клиническая медицина. – 2012. – №1(90). – С.47 – 49.
34. Назыров, Ф.Г. Особенности развития и течения осложнений цирроза печени в зависимости от этиологического фактора / Ф.Г.Назыров, А.В.Девятов, А.Х.Бабаджанов, С.А.Раимов // Новости хирургии. – 2013. – №4(21). – С.45–50.
35. Николаева, Л.И. Анализ влияния генетических факторов вируса гепатита С и полиморфизма генов инфицированных людей на развитие фиброза печени / Л. И. Николаева [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2012. – № 5. – С. 7–13.
36. Николаева, Л.И. Цирроз печени и гепатоклеточная карцинома у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С: эпидемиологические и молекулярно-генетические аспекты / Л.И. Николаева, Е.А. Лейбман, Г.В. Сапронов, А.Н. Юдин // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – №2. – С.40 – 51.
37. Останин, А.А. Мультиплексный анализ 26 цитокинов, секретируемых клетками крови больных циррозом печени / А.А. Останин, Н.М. Старостина, И.В. Меледина, М.В. Шипунов, О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология, 2015. – № 6(17) – С. 539 – 552.
38. Павлов, А.И. Алкогольная болезнь печени диагностика и лечение в многопрофильном стационаре / А.И.Павлов//Эффективная фармакотерапия. – 2013. – №41. – С.30 – 37.
39. Павлов, А.И. Лабораторная диагностика интоксикации алкоголем у лиц с алкогольной болезнью печени/А.И.Павлов, А.И.Хазанов// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – № 1. – С. 41– 51.

40. Пузырева, Л.В. Генетический полиморфизм цитокинов: прошлое и будущее / Л.В. Пузырева, А.Д. Сафонов // Инфекция и иммунитет. – 2016. – №2(6). – С. 103 – 108.
41. Рачковский, М.И. Оценка прогностической роли альфа-фетопротеина при циррозе печени: результаты 3-летнего наблюдения / М.И. Рачковский, Г.Э. Черногорюк, Е.В. Белобородова, Э.И. Белобородова, Т.П. Калачева, А.А. Шаловой // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9 (2). – С. 724–728.
42. Рачковский, М.И. Прогнозирование наступления летального исхода больных циррозом печени вирусной и алкогольной этиологии / М.И. Рачковский, Э.И. Белобородова, Е.В. Белобородова, Ю.И. Синичева // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 8 (115). – С. 20 – 23.
43. Рязанцева, Н.В. Аллельный полиморфизм генов ИЛ-4 и ИЛ-10 как один из возможных механизмов, способствующих хронизации вирусных гепатитов / Н.В. Рязанцева, В.И. Коненков, В.В. Новицкий, С.Б. Ткаченко, И.О. Наследникова, Е.В. Белобородова, В.В. Авдошина, А.П. Зима // Иммунология. – 2007. – №2. – С. 68 – 72.
44. Сапронова, Н.Г. Особенности лечения пациентов с вирусассоциированным циррозом печени / Н.Г. Сапронова, С.В. Лукьянов, Е.В. Чигаева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – №6. – С.581.
45. Силачева, М.В. Цирроз печени и рак желудка: современное состояние проблемы / М.В. Силачева, Е.Г. Грищенко, М.М. Петрова, Н.Н. Николаева, О.А. Байкова, Л.В. Николаева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №3. – С.187 – 189.
46. Симбирцев, А.С. Цитокины в лабораторной диагностике / А.С. Симбирцев, А.А. Тотолян // Инфекционные болезни. – 2015. – №2. – С.82 – 98.
47. Скуратов, А.Г. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма генов IL-4, TNF-а у пациентов с циррозом печени и портальной гипертензии /

- А.Г.Скуратов, А.Н.Лызииков, Е.В. Воропаев, О.В.Осипкина // Проблемы здоровья и экологии. – 2017. – С.110 – 114.
- 48.Скуратов, А.Г. Уровень интерлейкина-6 как показатель тяжести цирроза печени и портальной гипертензии/А.Г. Скуратов, А.Н. Лызииков, Е.В. Воропаев, О.В. Осипкина // Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – С.113.
- 49.Тайшин, Д.О. Анализ прогностических шкал для оценки исхода цирроза печени / Д.О. Тайшин, Г.С. Солдатова // Вестник НГУ. Сер.: Биология, клиническая медицина. – 2014. – №2. – С. 76 – 85.
- 50.Фишман, Б.Б. Динамика и взаимосвязи сывороточных концентраций интерлейкина-2, интерлейкина-6, фактора некроза опухоли альфа при циррозах печени вирусной этиологии / Б.Б.Фишман, В.В.Зурабов, В.Е. Куликов, М.Э. Хапман, М.А.Тонеева, С.Ш. Бутримова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия. – 2017. – Т. 9, №2. – С. 42 – 46. DOI:10.22328/2077-9828-2017-9-2-42-46.
- 51.Хазанов, А.И. Хроническая интоксикация алкоголем и заболевания печени / А.И. Хазанов, С.В. Плюснин, С.А. Белякин, А.П. Васильев, А.Н. Бобров, А.И. Павлов, С.Г. Пехташев // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2009. – № 1. – С. 43–52.
- 52.Черешнев, В.А. Иммунология воспаления: роль цитокинов/ А.В.Черешнев, Е.Ю. Гусев //Медицинская иммунология. – 2001. – №3(3). – С.361 – 368.
53. Шапиро, И.Я. Особенности иммунного ответа и цитокиновый статус при различных вариантах течения цирроза печени / И.Я.Шапиро, О.О.Сек, Б.Е.Кноринг // Медицинская иммунология. – 2002. – Т. 4, №4–5. – С.545–552.
- 54.Шептулина, А.В. Неинвазивная диагностика фиброза печени: роль сывороточных маркеров / А. Ф. Шептулина, Е. Н. Широкова, В. Т. Ивашкин // РЖГГК он-лайн – www.gastro-j.ru-2015. – №2. – С.28 – 40.

55. Широких, И.Н. Диагностика фиброза печени: идеальны ли методы? / И.Н.Широких, Л.А. Мавлитова, А.В. Туев, О.В. Хлынова // Пермский медицинский журнал. – 2013. – Т. 30, №3. – С.93 – 102.
56. Шевченко, А.В. Функциональный полиморфизм генов семейства VEGF/ А.В.Шевченко, В.И.Коненков //Цитокины и воспаление. – 2012. – Т. 11, №.4. – С. 14 – 20 .
57. Шелудько В.С. Теоретические основы медицинской статистики (статистические методы обработки и анализа материалов научно-исследовательских работ): Метод. рекомендации. Изд. 3-е, исправл. и доп. / Автор-сост.: В.С. Шелудько, Г.И. Девяткова. – ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России // – Пермь, 2016. – 80 с.
58. Щёктова, А.П. Чувствительность и специфичность определения гиалуроновой кислоты, коэффициента де Ритиса и ВЭФР для диагностики ХГ и ЦП / А.П. Щёктова, И.А. Булатова, А.П. Ройтман // Пермский медицинский журнал. – 2013. – Т. 30, № 4. – С. 84 – 89.
59. Ющук, Н.Д. Проблема вирусного гепатита С в Российской Федерации/ Н.Д. Ющук, О.О. Знойко, К.Р. Дудина, П.А. Белый // Терапевтический архив. – 2014. – №10. – С.77 – 81.
60. Яковенко, А.В. Цирроз печени, клиничко-патогенетические аспекты/ А.В. Яковенко, Э.П. Яковенко, Р.В. Карпова //Фарматека. – 2012. – №13. – С.32–36.
61. Albillos, A. Cirrosis-associated immune distinctive features and clinical relevance/A.Albillos, M. Lario, M.Álvarez-Mon// J Hepatol. – 2014. – Dec. – №61(6) – P. 1385.96.77
62. Bassendine, M. F. Lipids and HCV / M. F. Bassendine, D. A. Sheridan, S.H. Bridge, D. J. Felmlee, R. D. Neely // Semin. Immunopathol. – 2013. – № 35. – P. 87 – 100.

63. Biswas, A. Association of Interleukin-1 β and Gene Polymorphisms with Liver Pathogenesis in Hepatitis B Virus Infection among Eastern Indian Population/ A. Biswas, R. Panigrahi, M. Pal, BK De, S. Chakrabarti, MK Ghosh, BC Chandra Seth, S. Roychowdhury, R. Chakravarty // *J Clin Exp Hepatol.* – 2013. – №3. – P.281–287.
64. Bonnel, A.R. Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis/A.R. Bonnel, C. Bunchorntavakul, K.R. Reddy // *Clin Gastroenterol Hepatol.* – 2011. – № 9. – P.727–738.
65. Bowcock AM, Kidd JR, Lathrop GM, Daneshvar L, May LT, Ray A, Sehgal PB, Kidd KK, Cavalli-Sforza LL. The human “interferon-beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6” gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21 // *Genomics.* – 1988. – № 3. – P 8–16.
66. Bruix, J. Evidence-based diagnosis, staging, and treatment of patients with hepatocellular carcinoma/J. Bruix, M. Reig, M. Sherman // *Gastroenterology.* – 2016. – № 150. – P.835–853. (Bruix, 2016)
67. Buck, M. Novel inflammatory biomarkers of portal pressure in compensated cirrhosis patients/ M. Buck, G. Garcia-Tsao, R.J. Groszmann, C. Stalling, N.D. Grace, A.K. Burroughs [et al.] // *Hepatology.* – 2014. – №59. – P.1052 – 1059.
68. Cao, L.N. IL10 rs1800896 polymorphism is associated with liver cirrhosis and chronic hepatitis B / L.N. Cao, S.L. Cheng, W. Liu // *Genet Mol Res.* – 2016. – № 22. – P. 15(1).
69. Clària, J. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. /Clària J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, Amorós À, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Oetl K, Morales-Ruiz M, P. Angeli // *Hepatology.* – 2016/10. – Vol. 64(4) – P. 1249–1264.

70. Chen, C.H. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in chronic hepatitis C without hepatocellular carcinoma/ C.H. Chen, S.T.Lin, C.L. Kuo, C.K. Nien// *J. Hepatogastroenterology*. – 2008. – №55(85). – P.1423 – 1427.
71. Cox, ED. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6/ E.D. Cox, S.C. Hoffmann, B.S. Di Mercurio, R.A. Wesley, D.M. Harlan, A.D. Kirk, P.J. Blair// *Transplantation*. – 2001. – Vol. 72: – P. 720 – 726 .
72. Dirchwolf, M. Role of systemic inflammation in cirrhosis: From pathogenesis to prognosis/ M.Dirchwolf, A. Ruf // *J. Hepatol*. – 2015. – № 8. – P.1974 – 1981.
73. Dirchwolf, M. Immune dysfunction in cirrhosis: distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity/ M.Dirchwolf, A.Podhorzer, M.Morino, C.Shulman, M.Cartier, M.Sunino, S.Pas, A.Munos et al.// *J. Cytokine* – 2016. – №1(77). – 3.14–100.
74. El Serafy, M.A. APRI test and hyaluronic acid as non-invasive diagnostic tools for post HCV liver fibrosis: Systematic review and meta-analysis/M.A. El Serafy, A.M. Kassem, H. Omar, M.S. Mahfouz, M. El Said El Raziky// *Arab. J. Gastroenterol*. – 2017. – № 18(2) – 51 – 57.
75. Fishman, D. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis/ D. Fishman, G.Faulds, R.Jeffery, V.Mohamed-Ali, J.S.Yudkin, S.Humphries, P.Woo// *J. Clin. Invest*. – 1998. – № 102. – P. 1376.
76. Flodén, A. Calculation and comparison of the model for end-stage liver disease (MELD) score in patients accepted for liver transplantation in 1999 and 2004/A. Flodén, M. Castedal, S. Friman, M. Olausson, L. Backman// *Transplant Proc*. – 2007. – №39. – P.385–386.
77. Gäbele, E. Analysis of monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism in patients with spontaneous bacterial peritonitis/E. Gäbele, M. Mühlbauer, H. Paulo,

- M. Johann, C. Meltzer, F. Leidl [et al.] //World J Gastroenterol. – 2009. – №15. – P.5558–5562.
- 78.Giannitrapani, L. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma/ L. Giannitrapani, M. Soresi, D. Balasus, A. Licata, G. Montalto// World J Gastroenterol. – 2013. – April 28. – № 19(16) – P. 2449 – 2455.
- 79.Giannitrapani, L. IL-6 -174G/C polymorphism and IL-6 serum levels in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma/ L. Giannitrapani, M. Soresi , A. Giacalone, ME Campagna, M . Marasà, M.Cervello , S Marasà, G Montalto// OMICS. – 2011. – № 15. – 183–186.
- 80.Giron-Gonzalez, J.A. Adhesion molecules as a prognostic marker of liver cirrhosis/ J.A. Giron-Gonzalez, C. Martinez-Sierra, C. Rodriguez-Ramos, P. Rendon, M.A. Macias, C. Fernandez-Gutierrez [et al.]// Scand J Gastroenterol. – 2005. – № 40. – P.217–224.
- 81.Goyal, V. The relation between pathogenesis of liver cirrhosis, hepatic encephalopathy and serum cytokine levels: what is the role of tumor necrosis factor α ? /V. Goral, Y. Atayan, A. Kaplan // Hepatogastroenterology. – 2011. – №58(107-108). – P.943 – 948.
- 82.Huo, T.I. The sequential changes of the model for end-stage liver disease score correlate with the severity of liver cirrhosis in patients with hepatocellular carcinoma undergoing locoregional therapy/T.I. Huo, P.C. Lee, Y.H. Huang, J.C. Wu, H.C. Lin, J.H. Chiang [et al.]//J. Clin. Gastroenterol. – 2006. – №40(6). – P. 543 – 550.
- 83.Jakab, L. The liver and the immune system/ L. Jakab //Orv Hetil. – 2015. – №156(30). – P.1203 – 1213.

84. Jalan, R. Bacterial infections in cirrhosis: A position statement based on the EASL Special Conference 2013/ R.Jalan, J.Fernandes, R.Wiest *Hepatology*. – 2014. – №60 (6). – P.1310 – 24.
85. Kamath, P. S. The Model for End – Stage Liver Disease (MELD) /P. S.Kamath, W. R. Kim// *Hepatology*. – 2007. – № 3. – P. 797–805.
86. Krenkel, O. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease/ O. Krenkel , F.Tacke// *Nat Rev Immunol*. – 2017. – №17(5). – P.306 – 321.
87. Levesque, E. Prospective evaluation of the prognostic scores for cirrhotic patients admitted to an intensive care unit/E.Levesque, E.Hoti, D.Azoulay [et al.]// *J. Hepatology*. – 2012. – №56(1). – P.95 – 102.
88. Lin, S. Interleukin-6 as an early diagnostic marker for bacterial sepsis in patients with liver cirrhosis/ S. Lin, Z. Huang, M. Wang, Z. Weng, D. Zeng, Y. Zhang, Y. Zhu, J. Jiang // *J. Crit. Care*. – 2015. – №30(4). – P.732 – 738.
89. Lin, Z. H. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: an updated meta-analysis/Z.H.Lin, Y.N. Xin, Q.J. Dong, Q. Wang, X.J. Jiang, S.H. Zhan, Y. Sun, S.Y. Xuan// *J. Hepatology*. – 2011. – №53. – P.726 – 736.
90. Loeza-del-Castillo, A. AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver. Fibrosis/ A. Loeza-del-Castillo, F.Paz-Pineda, E. Oviedo-Cardenas // *Ann. Hepatol*. – 2008. – № 7(4) – P. 350 – 357.
91. Marcos M., Common polymorphisms in interleukin genes (IL4, IL6, IL8 and IL12) are not associated with alcoholic liver disease or alcoholism in Spanish men/ M. Marcos, I. Pastor, R. González-Sarmiento, F.J. Laso // *Cytokine* . – 2009. – № 45. – 158 – 161.
92. Martínez-Esparza, M. Inflammatory status in human hepatic cirrhosis/ M. Martínez-Esparza, M. Tristán-Manzano, A.J. Ruiz-Alcaraz, P.García-Peñarrubia // *World J. Gastroenterol*. – 2015. – №21(41). – P.11522 – 11541.

93. Migita, K. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection-association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma/ K.Migita, S. Miyazoe, Y. Maeda, M. Daikoku, S. Abiru, T. Ueki, K. Yano, S. Nagaoka, T. Matsumoto, K. Nakao, K. Hamasaki, H. Yatsuhashi, H. Ishibashi, K. Eguchi // *J. Hepatol.* – 2005. – №42 – P. 505-551.
94. Newton, K. Signaling in innate immunity and inflammation/ K. Newton, V.M. Dixit// *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2012. – №4(3).
95. Noor, M.T. Immune Dysfunction in Cirrhosis/ M.T.Noor, P. Manoria// *Clinical and Translational Hepatology.* – 2017. – № 10 – 5(1). – P. 50 – 58.
96. Olomolaiye, O. A novel polymorphism in the human IL-6 promoter. / O. Olomolaiye, N.A. Wood, J.Bidwell, L. Eur // *J. Immunogenet.* – 1998. – № 25. – P. 267.
97. Olson, J.C. Acute-on-chronic and Decompensated Chronic Liver Failure: Definitions, Epidemiology, and Prognostication/ J.C. Olson// *Crit Care Clin.* – 2016. – № 32(3).
98. Pieri, G. C-reactive protein and bacterial infection in cirrhosis/ G. Pieri , B. Agarwal , A.K. Burroughs // *Ann Gastroenterol.* – 2014. – №27(2). – P. 113 – 120.
99. Pinzani, M. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management/M.Pinzani, K.Rombouts, S. Colagrande// *J. Hepatol.* – 2005. – № 42. – P.22 – 36.
100. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection / Q. J. Gao [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 15(44). – P. 5610 – 5619.
101. Pugh, R. N. Transection of the esophagus in bleeding esophageal varices. R.N. Pugh, I.M. Murray-Lyon, J.L. Dawson, M.C. Pietroni, R.Williams// *Br. J. Surg.* – 1973. – Vol. 60(8). – P. 648–652.

102. Rahimi-Dehkordi, N. Model for End Stage Liver Disease (MELD) and Child – Turcotte – Pugh (CTP) Scores: Ability to Predict Mortality and Removal from Liver Transplantation Waiting List due to Poor Medical Conditions/ N.Rahimi-Dehkordi, K.Nourijelyani, M.Nasiri-Tousi, R.Ghodssi-Ghassemabadi, F.Azmoudeh-Ardalan, S. Nedjat // Archives of Iranian Medicine. – 2014. – Vol. 17, № 2. – P. 118–121.
103. Ribeiro, C.S. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients/ C.S. Ribeiro, J.E. Visentainer, R.A. Moliterno// Mem Inst Oswaldo Cruz. – 2007. – № 102. – 435 – 440.
104. Robinson, M. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis/ M. Robinson, C. Harmon, C. O’Farrelly //Cellular & Molecular Immunology. – 2016. – №13. – P.267–276.
105. Shi, M. Function of interleukin-17 and -35 in the blood of patients with hepatitis B-related liver cirrhosis/M. Shi, J .Wei, J .Dong, W .Meng, J Ma, T. Wang, N .Wang, Y .Wang//Mol Med Rep. – 2015. – №11. – P.121–126.
106. Sipeki, N. Immune dysfunction in cirrhosis/ N.Sipeki, P.Antal-Szalmas, P.LakatosandM. Papp// J.Gastroenterol.. – 2014. – № 20(10). – P.2564 – 2577.
107. Stewart Sell, M.D. Serum Alpha-Fetoprotein:A Prognostic Indicator of Liver-cell Necrosis and Regeneration Following Experimental Injury by Calactosamine in Rats/ M.D.Stewart Sell, B.S. David Stillman, B.S. Nathan Gochman, D.Ph//American Journal of Clinical Pathology. – 1976. – №5. – P.847 – 853.
108. Suliman, MAM. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis/ MAM Suliman, FMH Khalil, SA Alkindi Salam, Anil V Pathare, AAA Almadhani, and NAAI Soliman //World J. Gastrointest Pathophysiol. – 2012. – № 3(5). – P.92–98.
109. Tacke, F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases/ F. Tacke// J. Hepatol-2017. – №66(6). – P.1300 – 1312.

110. Tokushige, K. Influence of INF gene polymorphism and HLADRB1 haplotype in Japanese patients with chronic liver disease caused by HCV /K. Tokushige, N.Tsuchiya, K.Hasegawa [et al.]// Am. J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 98(1). – P. 160 – 166.
111. Topic, A. Diagnostic characteristics and application of alcohol biomarkers/ A. Topic, M.Djukic// Clin. Lab. – 2013. – Vol. 59. – № 3. – P. 233 – 245.
112. Varol, C. M. Macrophages: development and tissue specialization / C.Varol, A.Mildner, S. Jung // Ann Rev Immunol. – 2015. – № 33 – P.643–675.
113. Villar. L.M. Update on hepatitis B and C virus diagnosis/L.M. Villar, H.M. Cruz, J.R. Barbosa //World J Virol. – 2015. – № 4(4). – P.323 – 42.
114. Wai, C-T. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C/ C.T. Wai, J.K. Greenson, R.J. Fontana, J.D. Kalbfleisch, J.A. Marrero, H.S. Conjeevaram, A.S. Lok //Hepatology.- 2003. – Vol. 38, № 2. – P.518 – 526.
115. Weiskirchen, R. Cel Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology/R. Weiskirchen, F.Tacke// Hepatobiliary Surg Nutr. – 2014. – № 3. – P.344 – 363.
116. Wiesner, R. H. Model for End-Stage Liver Disease (MELD) and Allocation of Donor Livers / R. H.Wiesner, E.Edwards, R.Freeman, A.Harper, R.Kim, P. S.Kamath, W.Kremers, J.Lake, T.Howard, R. M.Merion, R. A.Wolfe, R.Krom// Gastroenterology. – 2003. – Vol. 124, № 1. – P. 91–96.
117. Yang, L. Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms/ L. Yang, E. Seki//Front. Physiol. – 2012. – №5. – P. 138.
118. Youden W.J.//Cancer. – 1950. – Vol. 3. – № 1. – P.32 – 35.
119. Zaman, A. Interleukin 6 Level Predicts Mortality in Patients with Cirrhosis/ A. Zaman, M.P.H .MD //Clin Gastroenterol Hepatol . – 2017.

120. Zhou, W.C. Pathogenesis of liver cirrhosis/W.C. Zhou, Q.B. Zhang, L. Qiao //J.Gastroenterol. – 2014. – № 20(23). – P. 7312–7324.
121. Zhu, Shao Ming M.D. Serum C-reactive protein predicts early mortality in hospitalized patients with HBV-related decompensated cirrhosis/ ShaoMing M.D. Zhu, Yulituzi M.D .Waili, XiaoTing M.D. Qi, YueMei M.D. Chen, YuFeng M.D. Lou, Bo M.D. Chen //Medicine. – 2017. – №96(4). – P.5988.
122. Zotova, N.V. Systemic inflammation: Methodological Approaches to Identification of the Common Pathological Process/ N.V. Zotova, V.A. Chereshev, E.Yu Gusev// Journal PloS One. – 2016 – № 11(5).