УДК [616.36-002.12:578.891]-07:[616.15+616.36]-074

Прогностическое значение определения Ил-6 в сыворотке крови и цитохрома Р450 в ткани печени у больных хроническим гепатитом С

Ю.В. Коротчаева[1], Л.М. Самоходская[2], А.И. Сперанский[3], Л.В. Козловская[1], Н.Б. Гордовская[1], А.В. Павленко[2], Н.А. Мухин[1,2], В.А. Ткачук[2]

([1]Клиника нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова,
[2]Кафедра биологической и медицинской химии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова,
[3]Лаборатория клинической иммунологии Института ревматологии РАМН)

Prognostic value of IL-6 in blood serum and cytochrome P450 in liver tissue in patients with chronic hepatitis C

Yu.V. Korotchayeva, L.M. Samokhodskaya, A.I. Speransky, L.V. Kozlovskaya, N.B. Gordovskaya, A.V. Pavlenko, N.A. Mukhin, V.A. Tkachuk

Цель исследования. Оценить связь уровня *интерлейкина-6* (Ил-6) в сыворотке крови больных *хроническим гепатитом С* (ХГС) с особенностями клинического течения, степенью фиброза и уровнем экспрессии цитохрома Р450 в печени для определения критериев прогноза заболевания.

Материал и методы. Обследовано 124 больных на разных стадиях течения ХГС, у которых был исследован уровень Ил-6 в сыворотке крови. У 36 пациентов при биопсии в ткани печени оценена экспрессия гена цитохрома Р450 изоформы CYP2E1.

Результаты. У больных с прогрессированием фиброза печени выявлены высокие уровни Ил-6 в сыворотке крови и ослабление экспрессии гена цитохрома Р450 в гепатоцитах, прямо коррелирующее со степенью фиброза печени и темпом его прогрессирования.

Заключение. На основании многофакторного дискриминантного анализа повышение Ил-6 в сыворотке крови больных ХГС является независимым фактором прогрессирования фиброза печени наряду с возрастом пациента и поражением почек.

Ключевые слова: хронический гепатит С, интерлейкин-6, экспрессия гена, цитохром Р450, фиброз печени, прогноз.

Aim of investigation. To estimate relation of *interleukin-6* (IL-6) level in blood serum of patients with *chronic hepatitis C* (CHC) with features of clinical course, degree of fibrosis and level of cytochrome P450 expression in liver for prognosis assessment.

Stuff and methods. Overall 124 patients at different stages of CHC were investigated with assessment of IL-6 level in blood serum. In 36 patients cytochrome P450 of isoform CYP2E1 gene expression was studied in liver tissue at biopsy samples.

Results. Patients with progression of liver fibrosis had high levels of IL-6 in blood serum and decrease of cytochrome P450 gene expression in hepatocytes, that positively correlated to degree of liver fibrosis and rate of its progression.

Conclusion. According to multifactor discriminant analysis elevation of IL-6 in blood serum of CHC patients is independent factor of liver fibrosis progression as well as the age and renal disease.

Key words: chronic hepatitis C, interleukin-6, gene expression, cytochrome P450, liver fibrosis, prognosis.

Хронический гепатит С (ХГС) по своей медицинской и социально-экономической значимости занимает одно из ведущих мест среди заболеваний человека. Он характеризуется прогрессирующим течением: при предполагаемой длительности течения HCV-инфекции от 9 до 29 лет частота исхода в *цирроз печени* (ЦП) составляет от 17 до 55% [3, 18, 19].

Среди факторов патогенеза ХГС, влияющих на характер течения и прогноз заболевания в целом, пристальное внимание в последние годы уделяют изучению Th2-пути иммунного ответа и *интерлейкину-6* (Ил-6) — провоспалительному цитокину [20]. Установлена, главным образом в эксперименте, роль Ил-6 в формировании фиброза в ткани печени; клинические работы этого направления немногочисленны и их результаты противоречивы [16, 17]. Малоизученным аспектом остается взаимодействие Ил-6 и системы цитохрома Р450 в печени. Ил-6 вызывает, с одной стороны, угнетение монооксигеназной активности цитохрома Р450, с другой стороны, депримация цитохрома Р450 в условиях вирусных инфекций, в том числе HCV, сопряжена с повышением продукции цитокинов, в частности Ил-6 [6—8, 22].

Цель исследования. Оценить связь уровня интерлейкина-6 в сыворотке крови больных ХГС с особенностями клинического течения, стадией фиброза и уровнем экспрессии цитохрома Р450 в печени для определения критериев прогноза заболевания.

Материал и методы исследования

Обследовано 124 больных ХГС — 65 женщин и 59 мужчин в возрасте от 17 до 73 лет (средний возраст — 43±13,8 года). Предполагаемая длительность течения заболевания — от 1 года до 45 лет (в среднем — 19,1±11,7 года). Диагноз ХГС подтвержден выявлением HCV RNA в сыворотке крови вирусологическим методом. В исследование не включали лиц, злоупотребляющих алкоголем, имеющих сочетанную инфекцию вирусами гепатитов В, дельта, иммунодефицита человека.

У всех больных определяли содержание криоглобулинов в сыворотке крови количественным методом. У 59 выполнено морфологическое исследование ткани печени с определением индексов гистологической активности и стадии фиброза по R.G. Knodell. У 42 пациентов был оценен темп нарастания фиброза по отношению индекса фиброза к длительности заболевания. Длительность заболевания определялась как период от момента наиболее вероятного времени инфицирования (по наличию фактора риска инфицирования — гемотрансфузии, наркомания и др.) или перенесенного острого вирусного гепатита до проведения морфологического исследования.

У 124 больных был исследован Ил-6 в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием тест-систем «Pro con» (ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург) и «Benter MedSystems» (Австрия).

Из 59 пациентов, у которых проводилась биопсия печени, у 36 была исследована экспрессия гена цитохрома Р450 изоформы CYP2E1 методом полуколичественной real-time *полимеразной цепной реакции* (ПЦР). Суммарную РНК выделяли из ткани печени с помощью набора «RNAeasy Kit» (коммерческий набор «Qiagen», Израиль) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Реакцию обратной транскрипции РНК проводили с использованием коммерческого набора ЗАО «Силекс» (Россия). Анализ экспрессии гена CYP2E1 выполняли методом ПЦР в режиме реального времени с применением интеркалирующего красителя SYBR Green (коммерческий набор «Синтол»). Для контроля в качестве вспомогательного гена использовали glyceraldehyde-3-phosphate дегидрогеназу (GAPDH) и β_2-микроглобулин. Праймеры к нуклеотидным последовательностям анализируемого гена подбирались с помощью программы «PrimerSelect» пакет DNASTAR (табл. 1). ПЦР проводили при условиях: 1-й этап — 95 °С 300 с, 2-й этап — 60—62 °С 40—50 с, 3-й этап — 95 °С 15 с с переходом на шаг № 2 (35—45 циклов). Оценивали выход продукта по отношению к GAPDH и β_2-микроглобулину. Данные выражения mRNA представлены как естественный логарифм произвольных единиц.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Statsoft Statistica 6.0. Достоверности различий межгрупповых средних оценивали с помощью дисперсионного анализа. Достоверными считали различия при $p<0,05$. Для выявления независимых критериев прогноза использовали многофакторный дискриминантный анализ.

Таблица 1

Праймеры для определения экспрессии гена CYP2E1

Праймер	Forward	Reverse
CYP2E1	5′-cgtgactgtggccgacctgtt ctt-3′	5′-aaaatggtgtcttgggttgcctca-3′
GAPDH	5′-tgcaccaccaactgcttggc-3′	5′-ggcatggactgtggtcatgag-3′
β_2-микроглобулин	5′-gatgagtatgcctgccgtgtg-3′	5′-caatccaaatgcggcatct-3′

Результаты исследования и их обсуждение

У большинства обследованных (63%) определена I стадия фиброза и у 23% – II стадия. Больные с III и IV стадиями составили меньшинство (соответственно 8 и 3%), однако в группу с IV стадией фиброза было включено 20 больных с клинико-лабораторными и УЗ-признаками ЦП (гепатоспленомегалия, портальная гипертензия), которым биопсия печени не проводилась. Клиническая картина поражения печени суммирована в табл. 2.

Из 42 больных с рассчитанным темпом прогрессирования фиброза печени более чем у половины (55%) отмечался медленный темп – менее 0,1 ед. фиброза/год (0,06±0,02), у 20% – средний – 0,1–0,13 ед. фиброза/год (0,10±0,01) и у 25% – быстрый – >0,13 ед. фиброза/год (0,45±0,57).

У 59 (48%) из общего числа обследованных наблюдались системные проявления, при этом частота *криоглобулинемии* (КГ) у этих больных составила 76%. По нашим данным, КГ являлась интегральным признаком, с которым сочетались другие системные проявления, спектр которых был достаточно широк: наиболее часто обнаруживалось поражение почек – у 20 (33%) и кожи – у 18 (31%), реже суставов – у 11 (19%), нервной системы – у 9 (16%), системы крови – у 7 (12%), синдром Шегрена – у 6 (10%), поражение щитовидной железы – у 5 (9%), легких – у 5 (9%) и наиболее редко регистрировалось поражение мышц– у 4 (19%), желудочно-кишечного тракта – у 2 (3%), синдром Рейно – у 2 (3%).

Уровень Ил-6 в сыворотке крови больных ХГС достигал в целом по группе 7,4±14,8 пг/мл (от 5 до 110 пг/мл), что превышает этот показатель у здоровых людей (до 5 пг/мл), частота выявления гиперпродукции Ил-6 составила 35% (у 44 из 124) и соответствовала данным литературы (34–37%). Из 44 больных с повышенным содержанием Ил-6 у большинства (66%) увеличение было умеренным (до 2 норм), у 27% – значительным (до 5 норм) и у 7% – выраженным (более 10 норм).

При сопоставлении содержания Ил-6 в сыворотке крови со стадией фиброза печени у 79 больных (в том числе у 20 с ЦП по клинико-лабораторным и УЗ-признакам) было установлено, что при нормальных показателях Ил-6 достоверно чаще (у 57%, p=0,005) отмечалась I (легкая) стадия фиброза, в то время как при повышенном уровне также достоверно чаще (у 52%, p=0,004) наблюдался цирроз (рис. 1).

В группе больных с нормальным содержанием сывороточного Ил-6 у большинства (64%) отмечался медленный темп прогрессирования фиброза. И напротив, при повышенных значениях Ил-6 достоверно чаще (у 67%, p<0,05) выявлялся быстрый темп прогрессирования последнего (рис. 2).

Полученные нами результаты согласуются с данными M. Malaguarnera и соавт. [17], S. Huang и соавт. [15], показавших, что у лиц, инфицированных HCV, высокая концентрация Ил-6 в сыворотке крови коррелирует со степенью морфологических изменений в ткани печени. По наблюдениям T.W. Lapinski [16], у больных ХГС умеренной степени активности содержание Ил-6 достоверно выше, чем при низкой степени активности. Результаты исследования Ил-6 у больных

Таблица 2

Характеристика печеночных проявлений ХГС

Симптомы	Число больных, *n*=124	%
Гепатомегалия	110	88,7
Желтуха	12	9,7
Признаки портальной гипертензии:		
спленомегалия	12	9,7
расширение воротной/селезеночной вен	15	12,0
варикозное расширение вен пищевода	11	8,8
асцит	7	5,6
Лабораторные показатели:		
повышение активности трансаминаз (АсАТ, АлАТ)	89	71,8
повышение содержания билирубина	12	9,7
Морфологическое исследование с определением стадии фиброза по R.G. Knodell:	59	–
I	38	64,4
II	14	23,7
III	4	6,8
IV	3	5,1

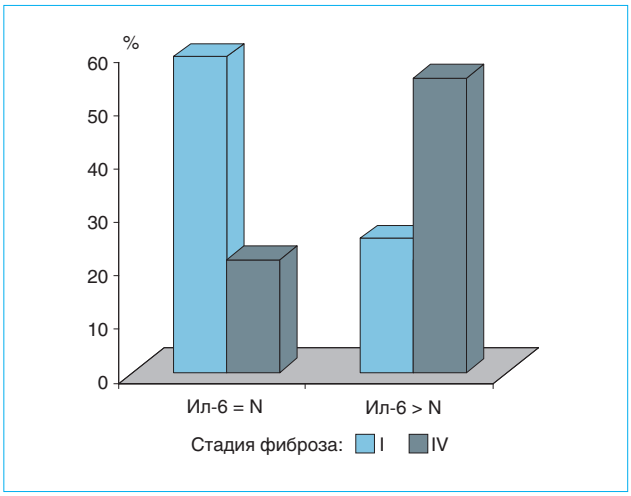

Рис. 1. Выраженность фиброза у больных ХГС в зависимости от уровня Ил-6 в сыворотке крови

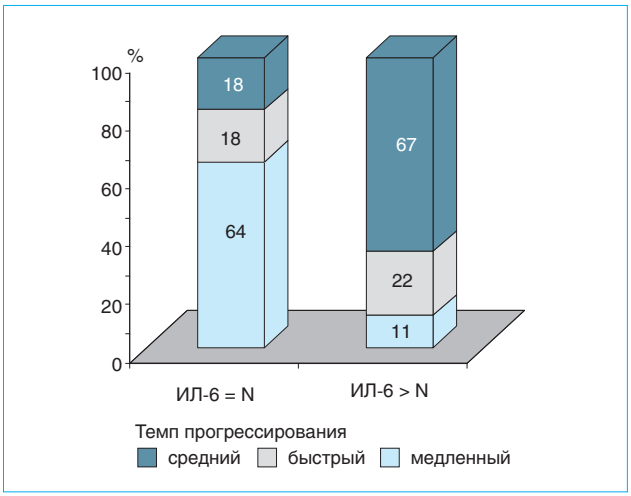

Рис. 2. Оценка темпа прогрессирования фиброза печени у больных с нормальным и повышенным уровнями Ил-6 в сыворотке крови

ЦП неоднозначны, но более часто констатируется его повышенный уровень [10]. Исходя из экспериментальных данных, стимуляция выработки интерлейкина-6 клетками Купфера при хронических заболеваниях печени приводит к продолжительному острофазовому воспалительному ответу со стимуляцией выработки сывороточного амилоидного А-белка, ингибированию глюконеогенеза, нарушению митохондриального дыхания и индукции гепатоцеллюлярного апоптоза, способствуя прогрессированию поражения печени [2, 4].

Оценка клинического течения заболевания в сравниваемых группах показала, что при гиперпродукции Ил-6 системные проявления выявлялись достоверно чаще — у 33 (75%) пациентов из 44, чем при его нормальной продукции — у 26 (27%) из 80 ($p<0,001$). Это касалось в первую очередь пурпуры, КГ, поражения почек — прогностически наиболее значимого показателя. КГ в группе обследованных с повышенным уровнем Ил-6 была обнаружена у 23 (53%) из 44, в противоположной группе — у 21 (26%) из 80 ($p=0,0039$), поражение почек — соответственно у 13 (30%) и у 7 (9%), кожи — у 11 (25%) и у 7 (9%). Та же закономерность отмечена и при определении частоты других системных проявлений: поражение суставов — у 7 (16%) и у 4 (5%), легких — соответственно у 4 (9%) пациентов первой группы и только у 1 (1%) — второй.

Патогенетическая роль Ил-6 в развитии криоглобулинемического васкулита с поражением почек подтверждается выявленной нами статистически значимой прямой связью уровня Ил-6 в сыворотке крови с величиной протеинурии ($Rs=0,36$, $p<0,001$) и криоглобулинемии ($Rs=0,22$, $p<0,01$), снижением скорости клубочковой фильтрации ($Rs=-0,27$, $p<0,05$), артериальной гипертензией ($Rs=0,24$, $p<0,05$). Обнаружена обратная корреляция уровня Ил-6 с выраженностью анемии ($Rs=0,25$, $p<0,01$), что согласуется с современными представлениями об активации под влиянием Ил-6 железорегуляторного пептида гипсидина — важного звена в механизме развития анемии при хронических заболеваниях. Схожие результаты получены G. Feldmann и соавт., выявившими более высокую концентрацию Ил-6 в сыворотке крови больных ХГС с КГ по сравнению с обследованными из группы контроля [13].

Поскольку одним из эффектов Ил-6 является его влияние на систему P450, в том числе на уровень mRNA белков различных изоформ цитохрома в гепатоцитах [6], мы исследовали в ткани печени 36 больных ХГС экспрессию гена цитохрома P450 изоформы CYP2E1. Была отмечена тенденция к снижению экспрессии mRNA CYP2E1 в группе больных с повышенным содержанием Ил-6 по сравнению с пациентами, имеющими нормальный уровень Ил-6 в сыворотке крови (0,7 против 1,5).

Способность препаратов очищенных рекомбинантных цитокинов вызывать угнетение цитохрома P450 была показана в эксперименте *in vivo* с введением животным IFNα, IFNβ и их смеси, а также *in vitro* при добавлении этих цитокинов в культуру гепатоцитов [1, 6, 8]. Депримирующее влияние на цитохром P450-зависимые монооксигеназы в печени было продемонстрировано для Ил-1 и TNF и в дальнейшем — для ряда других цитокинов (Ил-6, Ил-11, IFNγ). То есть практически все провоспалительные цитокины (Ил-1, TNF, Ил-6, Ил-11, IFNγ) и факторы роста (TGFβ, EGF, βFGF, αFGF, KGF) в той или иной степени ингибируют изоформы цитохрома P450. Этот механизм имеет важное регуляторное значение, обеспечивая сохранение необходимого уровня указанных ключевых регуляторов воспалительной реакции в условиях «иммунного» стресса [6–9, 21].

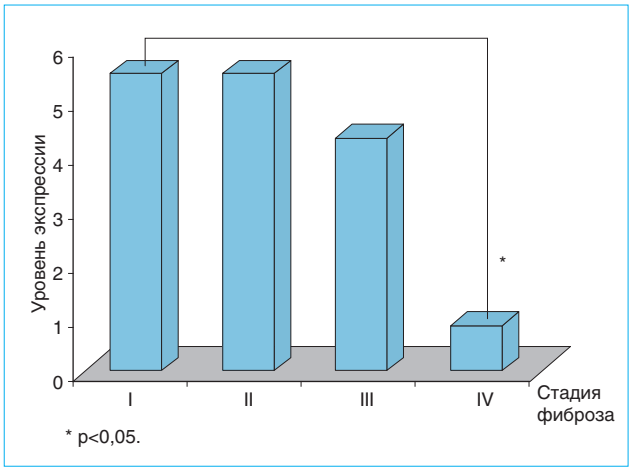

Рис. 3. Экспрессия гена цитохрома P450 в зависимости от стадии фиброза печени

При сопоставлении уровня экспрессии гена цитохрома P450 со степенью морфологических изменений в ткани печени оказалось, что при IV стадии фиброза (цирроз печени) уровень экспрессии mRNA CYP2E1 оказался достоверно ниже ($p<0,05$) по сравнению с I и II стадиями (рис. 3). Была выявлена также прямая достоверная корреляция между степенью снижения уровня экспрессии mRNA CYP2E1 и темпом прогрессирования фиброза ($Rs=0,28$, $p=0,03$).

Согласно данным литературы, снижение экспрессии цитохрома P450 в печени сопровождается нарушением процессов свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты [14]. Вследствие избыточного накопления продуктов перекисного окисления липидов происходит активация звездчатых клеток с повышением продукции коллагена — одного из основных компонентов экстрацеллюлярного матрикса (фиброза) [2, 18]. С другой стороны, повышение концентрации продуктов свободнорадикального окисления способствует стимуляции выработки цитокинов, в том числе Ил-6 [6, 15, 21].

С помощью монофакторного и многофакторного дискриминантного анализа нами выделены статистически значимые критерии прогноза течения ХГС. По результатам монофакторного анализа независимыми факторами неблагоприятного прогноза (прогрессирования в цирроз) были возраст пациента ($p=0,012$), уровень Ил-6 в сыворотке крови ($p=0,001$), экспрессия гена цитохрома P450 изоформы CYP2E1 ($p=0,03$), системные проявления, в том числе криоглобулинемия ($p=0,048$). При многофакторном анализе как независимые факторы прогноза имеют значение возраст пациента ($p=0,01$), уровень Ил-6 ($p=0,026$) и поражение почек ($p=0,015$).

Заключение

У больных хроническим гепатитом С отмечается повышение содержания в сыворотке крови интерлейкина-6, степень которого коррелирует с уровнем криоглобулинемии, частотой и клинической тяжестью связанного с ней клинического симптомокомплекса, включая поражение почек, а также со стадией фиброза печени и темпом его прогрессирования в цирроз.

При прогрессировании фиброза параллельно с нарастанием уровня Ил-6 наблюдается ослабление экспрессии гена цитохрома P450 в гепатоцитах, прямо коррелирующее со стадией фиброза и темпом его прогрессирования.

На основании многофакторного дискриминантного анализа повышение содержания интерлейкина-6 в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С является независимым фактором прогрессирования фиброза наряду с возрастом пациента и наличием у него поражения почек.

Список литературы

1. *Ахматов А.Т., Сибиряк С.В., Симбирцев А.С., Сибиряк Д.С.* Влияние рекомбинантного IL-16 на цитохром P450-зависимые монооксигеназы печени и почек, взаимосвязь со специфическими нейроэндокринными эффектами // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 1. — С. 32–38.
2. *Игнатова Т.М.* Хронический гепатит С. — М.: Практическая гепатология, 2004. — С. 78–96.
3. *Катикова О.Ю.* Болезни печени в пожилом возрасте: клинические проявления, особенности патогенеза, лечение // Клин. геронтол. — 2004. — № 7. — С. 22–27.
4. *Логинов А.С., Царегородцева Т.М., Зотина М.М.* и др. Интерлейкины при хроническом вирусном гепатите // Тер. арх. — 2001. — Т. 73, № 2. — С. 17–20.
5. *Масалова О.В., Абдулмеджидова А.Г., Моргунов К.В.* и др. Изменение показателей гуморального и клеточного иммунитета у пациентов с хроническим гепатитом С различной тяжести // Вопр. вирусол. — 2003. — Т. 48. — С. 15–19.
6. *Сибиряк С.В.* Цитокины как регуляторы цитохром P450-зависимых монооксигеназ. Теоретические и прикладные аспекты // Цитокины и воспаление. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 12–21.
7. *Сибиряк С.В., Вахитов В.А., Курчатова Н.Н.* Цитохром P450 и иммунная система. — Уфа: ГИЛЕМ, 2003. — 211 с.
8. *Сибиряк С.В., Красилова И.Л., Рябчинская Л.А.* и др. К вопросу о взаимодействии иммунной системы и монооксигеназной системы // Фармакол. токсикол. — 1992. — Т. 55, № 4. — С. 44–48.
9. *Симбирцев А.С.* Цитокины — новые системы регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1, № 1. — С. 9–16.
10. *Anuradha Budhu, Xin Wei Wang.* The role of cytokines in hepatocellular carcinoma // J. Leukoc. Biol. — 2006. — Vol. 80, N 6. — P. 1197–1210.
11. *Egawa K., Yoshida M., Kasai N.* An endotoxininduced serum factor that de presses hepatic aminolevulinic acid synthetase activity and cytochrome P450 levels in mice // Microbiol. Immunol. — 1981. — Vol. 25. — P. 1091–1097.
12. *Fang C., Lindros K., Badger T.* et al. Zonated expression of cytokines in rat liver: effect of chronic ethanol and the cytochrome P450 2E1 inhibitor, chlormethiazole // Hepatology. — 1998. — Vol. 27. — P. 1304–1310.

13. *Feldmann G., Nischalke H.D., Nattermann J., Banas B.* Induction of interleukin-6 by hepatitis C virus core protein in hepatitis C-associated mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma // Clin. Cancer Res. – 2006. – Vol. 12. – P. 4491–4498.
14. *Hasler J., Estabrook R., Murray M.* et al. Human cytochromes P450 // Mol. Aspects Med. – 1999. – Vol. 20. – P. 1–137.
15. *Huang Y.S., Hwang S.J., Chan C.Y.* et al. Serum levels of cytokines in hepatitis C –related liver disease: a longitudinal study // Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei). – 1999. – Vol. 62. – P. 327–333.
16. *Lapinski T.W.* The levels of cytokines in HCV patients // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2001. – Vol. 49. – P. 311–316.
17. *Malaguarnera M., Di Fazio I., Laurino A.* et al. Serum interleukin 6 concentrations in chronic hepatitis C patients before and after interferon-α treatment // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. – 1997. – Vol. 35. – P. 385–388.
18. *Marcellin P., Asselah T., Boyer N.* Fibrosis and disease progression in hepatitis C // Hepatology. – 2002. – Vol. 36 (suppl. 1). – P. 47–57.
19. *Marcellin P., Benhamou I.P.* Chronic hepatitis C // Progress in liver diseases / Eds. *I.G. Bouer, R.K. Ocknez*. – N.-Y., 1995. – Vol. B. – P. 39–49.
20. *Marinho R.T., Pinto R., Santos M.L.* et al. Effects of interferon and ribavirin combination therapy on CD4+ proliferation, lymphocyte activation, and Th1 and Th2 cytokine profiles in chronic hepatitis C // J. Viral Hepatol. – 2004. – Vol. 11. – P. 206–216.
21. *Poynard T., Ratziu V., Charlotte F.* et al. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C // J. Hepatol. – 2001. – Vol. 34, N 5. – P. 730–739.
22. *Siewert E., Bort R., Kluge R.* et al. Hepatic cytochrome P450 downregulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent // Hepatology. – 2000. – Vol. 32. – P. 49–55.