

## Cytokiny a wybrane parametry kliniczne u osób hospitalizowanych z powodu uzależnienia od alkoholu

Cytokines and selected clinical parameters in subjects hospitalized due to alcohol dependency

**Beata Augustyńska<sup>1</sup>, Marcin Ziółkowski<sup>1</sup>, Izabela Kubiszewska<sup>2</sup>, Beata Łangowska-Grodzka<sup>1</sup>, Damian Czarnecki<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Zakład Pielęgniarstwa Psychiatrycznego Collegium Medicum UMK, Bydgoszcz

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Immunologii Collegium Medicum UMK, Bydgoszcz

**Abstract – Introduction.** Hepatic fibrosis, the leading factor to cause liver cirrhosis, is a fatal complication of alcohol dependency. Factors believed to promote liver cirrhosis development are: excessive alcohol consumption, malnutrition, and female sex.

The aim of the present study was to evaluate whether subjects admitted to the hospital due to alcohol dependence with having higher plasma levels of proteins regarded as potential biochemical „hepatic fibrosis markers” differ significantly from hospitalized alcohol dependent patients with lower levels of those proteins, in regard to some selected clinical features.

**Method.** 55 male subjects admitted to the hospital due to alcohol dependence were studied along with 37 health subjects in control group. In all subjects, a clinical history was taken, psychometric tests were performed using BDI and SADD, and levels of biochemical „hepatic fibrosis markers” were assessed, including: IL 6, IL 10, IL 12 (interleukin 6, 10, 12), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), and TGF- $\beta$  (transforming growth factor).

**Results.** Based on the results the following conclusions were made: 1) Among the five cytokines in the study, we observed a significant increase of only TGF- $\beta$  in the alcoholic group compared to control group. 2) Our results may suggest that the relative risk of liver cirrhosis development is higher in subjects drinking larger amounts of alcohol and being malnourished. 3) Preventive measures against liver cirrhosis and fibrosis should be targeted at all patients admitted to the hospital due to alcohol dependence.

**Key words:** alcoholic hepatitis, fibrosis, cytokines, alcoholism, alcohol dependence

**Streszczenie – Wstęp.** Włóknienie wątroby, prowadzące do jej marskości, jest śmiertelnym powikłaniem uzależnienia od alkoholu. Za czynniki sprzyjające rozwojowi marskości uważa się konsumpcję dużych ilości alkoholu, niedożywienie oraz płeć żeńską.

Celem niniejszych badań była ocena, czy chorzy z wyższymi stężeniami białek – uważanych za potencjalne biochemiczne „markery włóknienia wątroby” – hospitalizowani z powodu uzależnienia od alkoholu różnią się pod względem wybranych cech klinicznych od osób z niskimi stężeniami tych białek, hospitalizowanych z tego samego powodu.

Praca sfinansowana z grantu przyznanego na badania własne przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika, BW 12/2005

*Metoda.* Badania wykonano u 55 mężczyzn hospitalizowanych ze względu na uzależnienie od alkoholu. U wszystkich przeprowadzono wywiad kliniczny, dokonano oceny psychometrycznej przy użyciu skal BDI i SADD oraz wykonano oznaczenia biochemiczne cytokin: IL 6, IL 10, IL 12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ . W grupie kontrolnej, u 37 zdrowych osób wykonano również oznaczenia wymienionych cytokin.

*Wyniki.* Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków: 1) Spośród badanych 5 cytokin, jedynie w przypadku cytokiny TGF- $\beta$  stwierdzono wyższe jej stężenie w grupie pacjentów niż w grupie kontrolnej. 2) Wyniki badań mogą sugerować, że istnieje relatywnie wyższe ryzyko rozwinięcia się marskości wątroby u osób uzależnionych od alkoholu, pijących dużo i niedożywionych. 3) Oddziaływaniami profilaktycznymi mającymi zapobiegać powstawaniu chorób wątroby, z włóknieniem wątroby, powinny być objęte wszystkie osoby leczone szpitalnie z powodu uzależnienia od alkoholu.

**Słowa kluczowe:** włóknienie wątroby, cytokiny, alkoholizm, uzależnienie od alkoholu

## WSTĘP

Marskość wątroby stanowi jedno z najpoważniejszych somatycznych powikłań nadużywania alkoholu; w USA co roku umiera z tego powodu 26.000 osób. Badania epidemiologiczne wskazują, że 40–90% chorych z marskością wątroby, to osoby, które nadużywają alkoholu (1). Mimo że patomechanizm włóknienia wątroby u osób nadużywających alkoholu jest już w miarę poznany, to nadal pozostaje niewyjaśnione, dlaczego tylko u relatywnie niewielkiego odsetka osób z tej grupy dochodzi do powstania marskości. Za czynniki sprzyjające rozwojowi marskości wątroby uważa się konsumpcję dużych ilości alkoholu, niedożywienie oraz płęć żeńską (1, 2, 3).

Obecnie dostępne są badania laboratoryjne, które pozwalają określić, czy u danej osoby nie ma nadmiernego stężenia czynników, które – jak się uważa – mogą być odpowiedzialne za proces włóknienia wątroby. Należą do nich oznaczenia stężenia cytokin, chemokin, metaloproteinaz, które to badania, jak się sądzi, pozwalają stwierdzić, czy nie dochodzi do nadmiernego wytwarzania kolagenu, innymi słowy czy można podejrzewać rozwój procesu marskości wątroby. Wymienione parametry biochemiczne nazywane są niekiedy biochemicznymi „markerami włóknienia wątroby” (2, 4, 5, 6, 7, 8).

W chwili obecnej, mimo rozwoju badań biochemicznych, nie określono ściśle cech obrazu klinicznego osób z zespołem zależności alkoholowej (ZZA), cech które miałyby związek z podwyższeniem stężenia wspomnianych oznaczeń biochemicznych. Umożliwiłoby to typowanie chorych do bardziej intensywnej diagnostyki potencjalnego procesu włóknienia wątroby lub do objęcia ich działaniami profilaktycznymi w celu zmniejszenia ryzyka powstania marskości (2, 3, 9).

Celem niniejszych badań była ocena, czy chorzy hospitalizowani z powodu uzależnienia od alkoholu różnią się stężeniem cytokin od osób zdrowych z grupy kontrolnej oraz czy osoby z wyższymi stężeniami białek (uważanych za potencjalne biochemiczne „markery włóknienia wątroby”) hospitalizowane z powodu ZZA różnią się pod względem wybranych cech klinicznych od osób z niskimi stężeniami tych białek, hospitalizowanych z tego samego powodu.

## METODA

Badania przeprowadzono u 55 mężczyzn w wieku  $43 \pm 8$  lat, z kliniczną diagnozą uzależnienia od alkoholu (ICD-10), z czasem trwania uzależnienia  $11 \pm 8$  lat, leczonych na Oddziale Leczenia Uzależnień Katedry i Kliniki Psychiatrii CM UMK w Bydgoszczy. Osoby badane nie były uzależnione od innych substancji psychoaktywnych (z wyjątkiem nikotyny), utrzymywały abstynencję od alkoholu średnio przez  $20 \pm 30$  dni przed badaniami. Z grupy wykluczono osoby, które chorowały na żółtaczkę zakaźną.

U wszystkich badanych przeprowadzono wywiad kliniczny z uwzględnieniem czasu trwania uzależnienia, oceny konsumpcji alkoholu przed hospitalizacją (śr.  $20 \pm 30$  dni) i oceniono Body Mass Index (BMI) – śr.  $24 \pm 3$ . Wykonano również ocenę psychometryczną przy użyciu Inwentarza Depresji Becka (BDI, Beck Depression Index) – śr.  $19 \pm 10$  punktów (10) oraz Short Alcohol Dependence Data Questionnaire (SADD) – śr.  $24 \pm 7$  punktów (11).

Grupę kontrolną stanowiło 37 mężczyzn, o średniej wieku 37 lat, którzy na podstawie wywiadu zostali zakwalifikowani jako osoby zdrowe i nie nadużywające alkoholu.

Badania laboratoryjne objęły wykonanie oznaczeń: IL 6, IL 10, IL 12 (*interleukin 6, 10, 12*), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*), TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*).

Do oznaczenia poziomów cytokin wykorzystano metodę immunoenzymatyczną ELISA. Wszystkie próby oznaczano przy użyciu zestawów OptEIA<sup>TM</sup> firmy Becton Dickinson. Oznaczenia dokonano w płaskodennych, 96-dołkowych, polistyrenowych mikroplątkach firmy Labsystems, które wcześniej opłaszczono monoklonalnymi, mysimi, anty-ludzkimi przeciwciałami pierwotnymi.

Absorbancję badanych prób mierzono za pomocą automatycznego czytnika typu iEMS Reader MF (Labsystems NY, Finlandia). Obliczeń dokonano przy użyciu programu komputerowego Genesis wersja 2.2, który pozwolił na analizę danych i ich przeliczenie na bezwzględne wartości stężeń wyrażone w pg/ml.

W ocenie statystycznej wyników posłużono się programem statystycznym SPSS-12.

Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy (KB/403/2004). Po przedstawieniu pełnej informacji dotyczącej badania i wyjaśnieniu celu, pacjenci i osoby zdrowe z grupy kontrolnej wyrazili zgodę na udział w nim.

## WYNIKI

W tabeli 1 przedstawiono wyniki porównania stężenia cytokin u 37 osób z grupy kontrolnej z wynikami u 55 osób uzależnionych od alkoholu.

Zgodnie z tym co przedstawiono w tabeli 1, jedynie stężenie TGF- $\beta$  u osób z ZZA było znamienne wyższe niż u osób z grupy kontrolnej.

Tabela 1.

Porównania stężenia cytokin u 37 osób z grupy kontrolnej z wynikami u 55 osób uzależnionych od alkoholu. W tabeli podano średnią, odchylenie standardowe, do porównania użyto test t-studenta

Comparison in levels of cytokines in 37 subjects from control group with results of 55 alcohol dependent subjects. In table are average, standard deviation; in comparison was used t-Student test

Zmienna <i>Variable</i>	Grupa kontrolna <i>Control group</i> n = 37	Grupa osób uzależnionych <i>Alcohol dependent subjects</i> n = 55	P
IL 6 pg	2,38 ± 9,03	1,03 ± 6,77	NS
IL 10 pg	9,37 ± 34,31	22,52 ± 90,06	NS
IL 12 pg	54,01 ± 94,21	40,28 ± 72,99	NS
TNF alfa pg	0,64 ± 3	9,83 ± 54,53	NS
TGF beta pg	64,34 ± 280,54	615,39 ± 1668,84	0,02

Na następnym etapie analizy wyników posłużono się jednoczynnikową analizą wariancji w celu wyłonienia ewentualnych czynników klinicznych, związanych ze stężeniem badanych cytokin. Porównywano dane kliniczne: wiek, czas trwania uzależnienia od alkoholu, długość abstynencji przed hospitalizacją, BMI, punktację skal BDI oraz SADD osób z zerowym stężeniem IL 10 z danymi osób ze stężeniem IL 10 powyżej zera. Analogicznie postąpiono w przypadku IL 6, IL 12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ .

Wykazano, że osoby z niższymi wartościami TNF- $\alpha$  miały wyższy BMI niż osoby z wyższymi wartościami TNF- $\alpha$  (24 vs 22,  $p = 0,033$ ). Co ciekawe, stwierdzono, że osoby starsze miały niższe wartości TGF- $\beta$  niż osoby młodsze (44 vs 38 lat,  $p = 0,041$ ).

## OMÓWIENIE

Wyniki badań wskazują, że wbrew oczekiwaniom, spośród pięciu badanych cytokin, jedynie stężenie TGF- $\beta$  u osób uzależnionych od alkoholu było wyższe niż u osób z grupy kontrolnej. Zbieżne byłoby to z wynikami badań innych autorów przypisującym TGF- $\beta$  duże znaczenie w procesie włóknienia wątroby (7, 12, 13, 14). Dalszych badań wymaga ocena przydatności badania stężenia pozostałych czterech cytokin dla stwierdzenia zagrożenia włóknieniem wątroby u osób uzależnionych od alkoholu.

Wyniki badań pokazują, że nie można wyodrębnić takich cech obrazu klinicznego, które jednoznacznie wskazywałyby lekarzowi, że u danego chorego należy zwrócić szczególną uwagę na ocenę, czy nie zagraża mu proces włóknienia wątroby. Spożywanie alkoholu może być przyczyną wzmożonej produkcji cytokin w wątrobie, co prowadzi do choroby wątroby, a w późniejszej fazie – do włóknienia tego narządu (6, 7, 15, 16, 17). Uznaje się, że cytokiny TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$

odgrywając prominentną rolę w apoptozie, co jest częścią odpowiedzi na zależną od alkoholu destrukcję wątroby. Wielu autorów potwierdza wzrost stężenia cytokin u osób nadużywających alkoholu (1, 2, 3, 16, 18, 19, 20)

Stwierdzenie przez nas związku wyższego stężenia TNF- $\alpha$  z niższymi wartościami BMI jest zbieżne z sugestiami niektórych badaczy, że czynnikiem ryzyka powstania marskości wątroby jest zły stan odżywienia (1, 2, 3).

Wykazane przez nas wyższe wartości TGF- $\beta$  u osób młodszych mogłyby sugerować, że marskością wątroby bardziej zagrożone są osoby z „żywiolowym” przebiegiem uzależnienia od alkoholu, a więc, jak można sądzić, konsumujące większe ilości alkoholu. Jest to zbieżne z twierdzeniami innych badaczy o istnieniu pozytywnego związku wyższej konsumpcji alkoholu z większym ryzykiem zachorowania na marskość wątroby (1, 2, 3, 9).

Stwierdzone przez nas niewielkie różnice obrazu klinicznego chorych z podwyższonymi biochemicznymi wskaźnikami zagrożenia marskością wątroby, w porównaniu z chorymi bez podwyższenia tych wskaźników wskazują, że przy ocenie zagrożenia marskością wątroby powinno się z równą starannością traktować wszystkich chorych, ze szczególnym uwzględnieniem osób, które są niedożywione czy piją duże ilości alkoholu.

Ograniczeniem naszej pracy jest stosunkowo niewielka liczba osób biorących udział w badaniach oraz brak kobiet, stąd wyniki badań mają charakter pilotażowy i sformułowane na ich podstawie wnioski winny ulec potwierdzeniu w innych badaniach.

## Wnioski

1. Spośród badanych 5 cytokin, jedynie w przypadku TGF- $\beta$  stwierdzono wyższe jej stężenie w grupie osób uzależnionych od alkoholu niż w grupie kontrolnej.
2. Wyniki badań mogą sugerować, że istnieje relatywnie wyższe ryzyko rozwinięcia się marskości wątroby w przypadku osób uzależnionych od alkoholu, pijących dużo i niedożywionych.
3. Oddziaływaniami profilaktycznymi mającymi zapobiegać rozwojowi chorób wątroby, z włóknieniem włącznie, powinny być objęte wszystkie osoby leczone szpitalnie z powodu uzależnienia od alkoholu.

## PIŚMIENNICTWO

1. National Institute of Health, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. 10<sup>th</sup> Special Report to the US Congress on Alcohol and Health. June 2000.
2. Neuman MG (2003) Cytokines – central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Research and Health*, 27, 4, 307–315.
3. Diaz LE, Montero A, Gonzales-Gross, Vallejo AI, Romeo J, Marcos (2002) Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 550–553.

4. Flisiak R (1999) Cytokiny w patogenezie włóknienia wątrobowego. *Przegląd Lekarski*, 56, 9, 604–607.
5. Kmieć Z (2003) Rola komórek gwiaździstych w regulacji funkcji wątroby. II. Współdziałanie z innymi komórkami w rozwoju włóknienia wątroby. *Postępy Biologii Komórki*, 1, 61–74.
6. Neuman MG (2001) Apoptosis in diseases of the liver. *Critical Reviews in Clinical and Laboratory Science*, 38, 109–166.
7. Kozłowska J (2000) Patogeneza włóknienia wątroby. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej CIV*, 3, 603–609.
8. Kozłowska J, Loch T, Jabłońska J, Cianciara J (2001) Biochemiczne wykładniki włóknienia w przewlekłym zapaleniu wątroby i w marskości wątroby o etiologii wirusowej. *Przegląd Epidemiologiczny*, 55, 451–458.
9. Frank J, Witte K, SchrodL W, Schutt Ch (2004) Chronic alcoholism causes deleterious conditioning of innate immunity. *Alcohol and Alcoholism: Medical Council on Alcohol*, 39, 5, 386–392.
10. Parnowski T, Jernajczyk W (1977) Inwentarz Depresji Becka w ocenie nastroju osób zdrowych i chorych na choroby afektywne (ocena pilotażowa). *Psychiatria Polska*, 417–425.
11. Raistrick D, Dunbar G, Davidson R (1983) Development of a questionnaire to measure alcohol dependence. *British Journal of Addiction*, 78, 89–95.
12. Beck B (2005) Współczesne poglądy na proces włóknienia wątroby. *Diagnostyka Laboratoryjna*, 41, 95–106.
13. Mazur W, Gonciarz M, Gonciarz Z (2003) Włóknienie wątroby – aspekty kliniczne. *Medycyna po dyplomie*, 12, 10, 30–39.
14. Gressner AM, Yagmur E, Lahme B, Gressner O, Stanzel S (2006) Connective tissue growth factor in serum as a new candidate test for assessment of hepatic fibrosis. *Clinical Chemistry*, 52 (9), 1815–1817.
15. Flisiak R, Wiercińska-Drapała A, Tynecka E (2000) Transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  w patogenezie chorób wątroby. *Wiadomości Lekarskie*, LIII, 9–10, 531–536.
16. McClain CJ, Shedlofsky S, Barve S, Hill DB (1997) Cytokines and alcoholic liver disease. *Alcohol Health and Research World*, 21, 4, 317–320.
17. Beck B (2005) Współczesne poglądy na proces włóknienia wątroby. *Diagnostyka Laboratoryjna*, 41, 95–106.
18. Katz GG, Shear NH, Malkiewicz IM (2001) Signaling for ethanol-induced apoptosis and repair in vitro. *Clinical Biochemistry*, 34, 219–227.
19. Diehl AM (1999) Nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease*, 19, 221–229.
20. Węgrzynek I, Żulikowska E, Pach D, Szczepański W (2004) Stan czynnościowy i morfologiczny wątroby u osób ostro zatrutych alkoholem i przewlekle od niego uzależnionych. *Przegląd Lekarski*, 61, 4, 229–234.

Adres do korespondencji

Beata Augustyńska

ul. Waryńskiego 31, 85-320 Bydgoszcz

e-mail: augustynska@op.pl

otrzymano 31.01.07

przyjęto do druku 30.04.07