

УДК: 616.36-002.2-022-002.17-07:616.12-078

**ДИАГНОСТИКА ФИБРОЗУ ПЕЧІНКИ
У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С:
СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ**

В.М. Козько, Н.В. Анциферова, Г.О. Соломенник, К.В. Юрко, О.Є. Бондар
О.М. Винокурова, Д.Б. Пеньков

Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна

У статті наведено огляд сучасних можливостей діагностики фіброзу печінки у хворих на хронічний гепатит С. У якості сироваткових маркерів фіброзу пропонується аналіз рівня матриксної металопротеїнази-1 та трансформуючий фактор росту- β 1. Доведена роль цих показників у процесах фіброгенезу.

Ключові слова: хронічний гепатит С, фіброз печінки, неінвазивна діагностика, матриксна металопротеїназа-1, трансформуючий фактор росту- β 1.

**ДИАГНОСТИКА ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ
У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С:
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

В.Н. Козько, Н.В. Анцыферова, А.О. Соломенник, Е.В. Юрко, А.Е. Бондарь,
О.Н. Винокурова, Д.Б. Пеньков

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

В статье представлен обзор современных возможностей диагностики фиброза печени у больных хроническим гепатитом С. В качестве сывороточных маркеров фиброза предлагается анализ уровней матриксной металлопротеиназы-1 и трансформирующего фактора роста- β 1. Доказана роль вышеуказанных показателей в процессах фиброгенеза.

Ключевые слова: хронический гепатит С, фиброз печени, неинвазивная диагностика, матриксная металлопротеиназа-1, трансформирующий фактор роста- β 1.

**DIAGNOSTICS OF LIVER FIBROSIS
IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C:
CURRENT STATE OF PROBLEMS AND PROSPECTS**

V. Kozko, N. Antsyferova, A. Solomennyk, K. Yurko, A. Bondar, O. Vinokurova, D. Penkov

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Review of contemporary options of liver fibrosis diagnostics in patients with chronic hepatitis C has been presented in the article. Analysis of MMP-1 and TGF beta-1 levels is used as an indicator of the liver fibrosis. The role of these indices in the process of fibrogenesis has been proven.

Key words: chronic hepatitis C, liver fibrosis, non-invasive diagnostics, matrix metalloproteinase-1, transforming growth factor- β 1.

Вступ. Фіброгенез у загальному розумінні – це універсальний процес, еволюційний шлях прогресування дифузних захворювань печінки, незалежно від етіологічного фактору, що зрештою призводить до її пошкодження. Фіброз печінки є результатом хронічного запалення органа з формуванням особливого варіанта клітинних взаємовідносин, що визначає розвиток позаклітинного матриксу (ПКМ), внаслідок чого відбувається незворотне порушення структури та функцій печінки [1].

В індустріально розвинутих країнах основною причиною розвитку фіброзу залишаються хронічний гепатит С (ХГС), алкогольна хвороба печінки та неалкогольний стеатогепатит [2, 3]. На теперішній час вже нема сумнівів, що при хронічній HCV-інфекції прогресуючий гепатит, фіброз, цироз і гепатоцелюлярна карцинома є ланками одного ланцюга. Тривалий безсимптомний перебіг ХГС надає необхідний для формування фіброзу та цирозу пе-

чінки час, що у свою чергу, потенціює ризик виникнення карциноми [4, 5].

До недавнього часу пункційна біопсія печінки вважалася “золотим стандартом” у визначенні фіброзу печінки, а ХГС залишався основним показником для її проведення [7–9]. Завдяки біопсії гістологічні дослідження можуть бути здійснені для верифікації головної причини хвороби, і для визначення гістологічної активності процесу та ступеня вираженості фіброзу [10]. Однак, причинами “непопулярності” “золотого стандарту” і досі залишаються: наявність протипоказань, потенційний ризик і побічні ефекти та ускладнення процедури, низька відновлюваність результатів та технічна складність процедури [11, 12].

Таким чином, важливим питанням у вирішенні проблеми діагностики фіброзу печінки є пошук нових ефективних діагностичних методів, які б набули широкого застосування у рутинній клінічній практиці. Розроблений і запропонований цілий ряд

альтернативних сироваткових маркерів фіброзу: гіалуронова кислота, колаген IV і VI типів, аполіпопротеїн A1, альфа-2-макроглобулін, феритин, холестерин, амінотрансферази, білірубін, YKL-40, цитокератин 18, параксонази та ін. Це послужило підставою для появи величезної кількості біохімічних тестів на фіброз печінки, а також комплексних фіброзних панелей, таких як APRI, Fibroindex, FibroMaxTest, ELF test, Fibrometer, Hepascore та ін [13-15]. Нажаль, численні клінічні дослідження з питань неінвазивної діагностики фіброзу печінки не можна визнати вичерпаними, оскільки в них, як правило, відсутнє досконале співставлення біохімічних показників з морфологічними маркерами хронічних гепатитів. Діагностична цінність багатьох показників фіброзу у пацієнтів з ХГС залишається практично невідомою.

Поряд із вище зазначеними речовинами, що безпосередньо пов'язані з фіброзом печінки, виникає інтерес до потенційної індикаторної здатності матричної металопротеїнази-1 (ММП-1) та трансформуючого фактору росту β 1 (ТФР- β 1) щодо наявності та/чи прогресування фіброзу печінки з урахуванням їх біохімічної та патофізіологічної схильності до реагування на, подібного роду, процеси.

ММП-1 – (інтестиціальна колагеназа, колагеназа хребетних, колагеназа фіброblastів та колагеназа I) – рівноправний учасник сімейства цинк-і кальцій-залежних ендопептидаз. ММП-1 синтезується фіброblastами, хондроцитами, макрофагами, керати-

ноцитами, ендотеліальними клітинами та остеобластами. Синтез ММП-1 стимулюється різними агентами, а саме: цитокінами, інтерлейкінами, хімічними сполуками, а також процесами, що перебігають на клітинній мембрані (злиття клітин і фагоцитоз). Інгібуються стехіометрично тканинними інгібіторами 1-го та 2-го типів та швидко α 2-макроглобуліном. Структурна послідовність амінокислотних залишків ММП-1 складається з N-термінального продомену, який відщеплюється під час активації і каталітичного домену, що містить цинкозв'язуючу ділянку, зв'язуючий пептид та C-термінальний гемопексинподібний домен. ММП-1 відіграє важливу роль у багатьох фізіологічних процесах, таких, як ембріональний розвиток, морфогенез, репродукція і тканинне ремодулювання. Головна їх функція зводиться до розщеплення основних білкових компонентів ПКМ. Крім того, ММП-1 здатна розщеплювати й інші субстрати: казеїн, желатин, ентактин, лінк-протеїн хряща [16, 17].

ТФР- β 1 – вперше виявлена ізоформа ТФР-2 субодиниці якої, що входять до його складу, кожна по 12,5 кДа, пов'язані дисульфідними містками. Тобто ТФР- β 1 секретується більшістю клітин у вигляді латентно асоційованого пептиду та латентно зв'язуючого білка. Ген ТФР- β 1, що кодує даний білок, знаходиться у людини на 19-й хромосомі. Цей білок являє собою поліфункціональний цитокін, який отримав назву через спроможність трансформувати нормальні фіброblastи в клітини, що здатні до неза-

лежного зростання. Згодом були виявлені основні типи біологічної активності ТФР- β 1: інгібіторна активність по відношенню до Т- і В-клітинної проліферації, лімфокин-активованих кілерів, а також до дозрівання та активації макрофагів та цитокінів; можливість стимулювати зростання деяких мезенхімальних клітин; імуносупресивний ефект та посилення формування ПКМ. ТФР- β 1 має 2 типи специфічних рецепторів, що володіють кіназною активністю та є залученими до трансдукції. Рецептор ТФР- β 1 – гетеротетрамерна серин-треонінкіназа, що активується шляхом фосфорилування білків SMAD [18–20].

Таким чином, передбачувана участь цих показників у процесі фіброзування обумовлена їх безпосереднім місцем та функціональною роллю в організмі людини.

Матеріали і методи дослідження.

У дослідження було включено 102 хворих на ХГС, які перебували на стаціонарному лікуванні в Обласній клінічній інфекційній лікарні м. Харкова, серед яких 68,6 % становили чоловіки та 31,4 % – жінки. Середній вік обстежених пацієнтів становив $43,8 \pm 2,5$ р. Контрольну групу склала 31 здорова особа (середній вік $40,6 \pm 1,2$ р.).

Діагноз ХГС встановлений на підставі клінічних, епідеміологічних, лабораторних, молекулярно-генетичних, серологічних та інструментальних показників, відповідно до загальноприйнятих критеріїв в клінічній практиці.

У частини хворих на ХГС оцінювали фіброз печінки за системою FibroMax (FibroTest), яку застосовува-

ли як альтернативу пункційній біопсії печінки для визначення достовірного статистичного взаємозв'язку між біохімічними показниками, що вивчалися, та фіброзом печінки.

Кількісне вимірювання вмісту MMP-1 та ТФР- β 1 у сироватці крові проводилося за допомогою імуноферментних наборів Human MMP-1 ELISA Kit (США) та TGF-B 1 ELISA Cat (США) на імуноферментному аналізаторі Libline-90. Використано метод твердофазного ензимпов'язаного імуносорбентного аналізу ("сендвіч"), принцип якого полягає в якісному і кількісному визначенні досліджуваного антигена шляхом його пошарового зв'язування зі специфічними моноклональними антитілами.

Статистична обробка отриманих результатів проводилась традиційними методами варіаційної та кореляційної статистики за допомогою пакета програм Statistica 6.0.

Результати дослідження та їх обговорення.

У клінічній картині хворих на ХГС переважали прояви гепатомегалічного (100%), астено-вегетативного (75,24%), диспепсичного (69,9%) синдромів. Рідше спостерігалися абдомінально-больовий (29,61%), гарячковий (25,24%), шкірно-жовтяничний (18,9%) та артралгічний (15,5%) синдроми.

Серед досліджених хворих F0 діагностовано у 7 (30,43%), F1 – у 5 (21,73%), F2 – у 4 (17,4%), F3 – у 3 (13,04%), F4 – у 4 (17,4%) осіб. При цьому генотип 1b траплявся у 65,22% випадках.

Аналіз стану біохімічних показників виявив достовірне підвищення вміс-

ту загального білірубину за рахунок його прямої фракції, β -глобулінів, активності АлАТ, лужної фосфатази, зниження вмісту $\alpha_{1,2}$ -глобулінів та альбумін-глобулінового коефіцієнта у сироватці крові. Таким чином, досліджувалися хворі, що переносили ХГС у маніфестній формі.

Нами було досліджено вміст ММП-1 та ТФР- β 1 у сироватці крові обстежених хворих (табл. 1).

Отримані результати дослідження вмісту ММП-1 у хворих на ХГС виявили достовірно зменшений рівень показника ($17,78 \pm 0,41$ нг/мл) проти аналогічного показника у контрольній групі ($24,16 \pm 1,38$ нг/мл, $p < 0,001$).

Аналіз вмісту ТФР- β 1 показав, що його рівень у обстежених хворих був достовірно підвищений ($5,7 \pm 0,21$ нг/мл) проти аналогічного значення у контрольній групі ($1,14 \pm 0,21$ нг/мл, $p < 0,001$) аж у 5 разів.

Вміст ММП-1, ТФР- β 1 у сироватці крові досліджували також у хворих на ХГС, яким визначали фі-

броз печінки за системою FibroMax (FibroTest), середні значення яких наведено у табл. 2.

Проведення кореляційного аналізу виявило наявність зв'язків між фіброзом печінки та вмістом у сироватці крові ТФР- β 1 (прямого сильного, $r = 0,96$, $p < 0,001$) та ММП-1 (зворотного сильного, $r = -0,95$, $p < 0,001$).

Як відомо, ключова роль у процесі фіброгенезу належить активованим зірчастим клітинам печінки, оскільки вони є головним джерелом протеїнів ПКМ та тканинних колагеназ. Активність стелатних клітин печінки проходить в результаті впливу продуктів клітин-учасниць запалення – клітин Купфера та ендотелію синусоїдів, серед яких особливе місце посідає ТФР- β 1, що продукується саме клітинами ендотелію синусоїдів. З іншого боку, ТФР- β 1 – фактор розвитку подальшої, так званої, автоактивації зірчастих клітин, коли останні не тільки продовжують “активувати самі себе”, но і мігрують у

Таблиця 1.

Вміст ММП-1, ТФР- β 1 у сироватці крові хворих на ХГС, $M \pm m$

Показник	Хворі на ХГС (n=102)	Контрольна група (n=24)	p
ММП-1, нг/мл	$17,78 \pm 0,41$	$24,16 \pm 1,38$	$< 0,001$
ТФР- β 1, нг/мл	$5,7 \pm 0,21$	$1,14 \pm 0,21$	$< 0,001$

Примітка: $M \pm m$ – середній показник та похибка середньої; p – ступінь достовірності.

Таблиця 2.

Вміст ММП-1, ТФР- β 1 у сироватці крові хворих на ХГС, обстежених за системою FibroMax (FibroTest), $M \pm m$

Показник	Хворі на ХГС (n=23)	Контрольна група (n=24)	p
ММП-1, нг/мл	$18,05 \pm 1,33$	$24,16 \pm 1,38$	$< 0,01$
ТФР- β 1, нг/мл	$5,15 \pm 0,54$	$1,14 \pm 0,21$	$< 0,001$

Примітка: $M \pm m$ – середній показник та похибка середньої, p – ступінь достовірності.

ділянки запалення. Секреція ТФР- β 1 триває також і тоді, коли стелатні клітини набувають вигляду міофібробластоподібних клітин. Ці клітини виявляють властивість виробляти компоненти ПКМ печінки. Але розвиток фіброзу скоріш пов'язаний з порушенням рівноваги самих процесів утворення та деградації ПКМ, ніж з його надлишковою продукцією. Рівновага між процесами синтезу та руйнування досягається за допомогою тканинних колагеназ – ММП та їх тканинних інгібіторів, а також апоптозу клітин, що надмірно виробляють компоненти ПКМ. ММП-1 – представник родини цинк-, кальцій-залежних ендопептидаз, яка залучена до руйнування таких складових ПКМ як колагени, протеоглікани, ламінін, фібронектин. Кількість повторно синтезованих ММП-1 регулюється переважно на рівні транскрипції, а протеолітична активність ММП-1, що вже існує, контролюється як активацією фібробластів, макрофагів, хондроцитів, кератиноцитів, ендотеліальними клітинами, остеобластами, так і інгібуванням активних ферментів ендогенними інгібіторами, α 2-макроглобуліном та тканинними інгібіторами ММП [133, 147, 170, 312]. За однією з версій, значне зниження ММП-1 може бути пов'язане з підвищенням вмісту їх тканинних інгібіторів [310]. Водночас, доведена роль деяких регуляторів системи фібринолізу, зокрема протейнази плазміну, у забезпеченні функціонування ММП-1 [205]. При цьому відомо, що α 2-макроглобулін володіє інгібуючими, щодо плазміну, властивостями,

а тому знижений вміст останнього у крові, у свою чергу, пригнічує активність ММП-1 [86, 304]. У 23 хворих на ХГС нами був досліджений вміст α 2-макроглобуліну як складової FibroTest. Отримані дані вказували на присутність тенденції до зворотного кореляційного зв'язку між вмістом α 2-макроглобуліну та активністю ММП-1 у сироватці крові. Відсутність чіткої зворотної кореляційної залежності, вочевидь, пов'язана з невеликою кількістю спостережень. Крім зазначеного, на систему тканинних колагеназ впливає й сам ТФР- β 1, чия профіброгенна активність реалізується через порушення їх синтезу та активацію тканинних інгібіторів ММП 1-го типу [312]. Отже, на підставі встановлення статистичних зв'язків між ММП-1, ТФР- β 1 та F, (визначеною за системою FibroMax (FibroTest)), вищезазначені показники можна вважати достовірними прямими сироватковими маркерами фіброзу печінки.

Висновок. На підставі встановлення статистичних зв'язків між ММП-1, ТФР- β 1 та фіброзом печінки (визначених за системою FibroMax (FibroTest)), доведено роль вищезазначених показників як сироваткових маркерів фіброзу. А саме: кореляційний аналіз між фіброзом печінки та вмістом у сироватці крові ТФР- β 1 виявив наявність прямого сильного, МПП-1 – зворотно сильного зв'язків. Отримано новий підхід щодо розгляду ММП-1 та ТФР- β 1 як єдиної системи взаємопов'язаних біохімічних індикаторів фіброзу.

Література

1. Павлов Ч.С. Возможность обратимости цирроза печени (клинические и патогенетические предпосылки) / Ч. С. Павлов, М. С. Золотаревский, Е. А. Томкевич [и др.] // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – № 1. – С. 20–29.
2. Федорченко С.В. Хроническая HCV-инфекция / С.В. Федорченко: – Киев : ВСИ “Медицина”, 2010. – 271 с.
3. Рахманова А. Г. Хронические вирусные гепатиты и цирроз печени. А. Г. Рахманова. – С.-Петербург: СпецЛит. – 2006. – 413 с.
4. Alves G. A. Quality of life of patients with hepatitis C / G. A. Alves, M. Z. Baldessar, G. W. Pereira. [et al.] // Rev. Soc. Bras. Med. Trop. – 2012. – № 45 (5). – P. 553–557.
5. McDonald S. A. Decrease in health-related quality of life associated with awareness of hepatitis C virus infection among people who inject drugs in Scotland / S. A. Mc Donald, S. J. Hutchinson, N. E. Palmateer NE [et al.] // Hepatology. – 2013. – № 58 (3). – P. 460–466.
6. Rockey D. Liver biopsy / D. C. Rockey, S. H. Caldwell, Z. D. Goodman [et al.] // Hepatology. – 2009. – № 49. – P. 1017–1044.
7. Boursier J. Comparison of accuracy of fibrosis degree classifications by liver biopsy and non-invasive tests in chronic hepatitis C / J. Boursier, S. Bertrais, F. Oberti [et al.] // BMC Gastroenterol. – 2011. – № 30. – P. 11:132.
8. Poynard T. Relative performances of FibroTest, Fibroscan, and biopsy for the assessment of the stage of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C : a step toward the truth in the absence of a gold standard / T. Poynard, V. de Ledinghen, J. P. Zarski [et al.] // Hepatology. – 2012. – № 56 (3). – P. 541–548.
9. Zarski J. P. Comparison of nine blood tests and transient elastography for liver fibrosis in chronic hepatitis C: the ANRS HCEP-23 study. / J. P. Zarski, N. Sturm // Hepatology. – 2012. – № 56 (1). – P. 55–62.
10. Зайцев И. А. Биопсия печени и неинвазивный мониторинг степени активности и стадий заболеваний у лиц с хроническими заболеваниями печени / И. А. Зайцев, В. В. Потий // Consilium medicum Ukraina. Спецвыпуск. – 2012. – С. 2–8.
11. Tannapfel A. The indications for liver biopsy / A. Tannapfel, H. P. Dienes, A. W. Lohse // Dtsch. Arztebl. Int. – 2012. – № 109 (27–28). – P. 477–483.
12. Poynard T. Performances of Elasto-FibroTest®, a combination between FibroTest® and liver stiffness measurements for assessing the stage of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C / T. Poynard, V. de Ledinghen, J. P. Zarski [et al.] // Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. – 2012. – № 36 (5). – P. 455–463.
13. Castera L. Non-invasive assessment of liver fibrosis: are we ready? / L. Castera, M. Pinzani // Lancet. – 2010. – № 375. – P. 1419–1420.
14. Poynard T. Biomarkers of liver fibrosis / T. Poynard, R. Morra, P. Ingiliz [et al.] // Adv. Clin. Chem. – 2008. – № 46. – P. 131–160.
15. Liu С.-Н. Неинвазивная диагностика фиброза печени при хроническом гепатите С с помощью доплерографии по индексу пульсации селезеночной артерии / С.-Н. Лиу, С.-J. Hsu, J.-W. Lin [et al.] // Клин. гастроэнтерол. гепатология. Русское издание. – 2008. – № 1 (2). – С. 101–109.
16. Lindor K. D. Heathcote Primary Biliary Cirrhosis / K. D. Lindor, M. E. Gershwin, R. Poupon // Hepatology. – 2009, July. – P. 291–308.
17. Bruno S. Futility of antiviral treatments for hepatitis C: An evolving concept entering the direct antiviral agents era / S. Bruno // Dig. Liver Dis. – 2012, Oct 24. – P. S1590–8658(12)00369-6.
18. Бурневич Э. З. Неинвазивные серологические маркеры фиброза печени / Э. З. Бурневич, М. С. Краснова // Гепатол. форум. – 2007. – №2. – С. 18–22.
19. Вельков В. В. Сывороточные биомаркеры фиброза печени: до свидания, биопсия? / В. В. Вельков. – М.: ЗАО “Диакон”, 2009. – 40 с.
20. Биохимия: учебник для вузов / Под ред. Е. С. Северина – 5 изд., – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 768 с.