

© Коллектив авторов, 2012

С.В. Романова, Е.А. Жукова, Т.А. Вигманова, Л.В. Коркоташвили

МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФИБРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ

ФГБУ «Нижегородский НИИ детской гастроэнтерологии» Минздравсоцразвития России, г. Н. Новгород, РФ

В статье представлены результаты исследования процессов фиброобразования у 172 детей с хроническими гепатитами, в их числе вирусной (вирусный гепатит В – НВВ и вирусный гепатит С – НСВ), аутоиммунной и наследственной (болезнь Вильсона–Коновалова) этиологии. У всех пациентов в крови определяли уровень сывороточных показателей фиброгенеза – гиалуроновой кислоты (ГК), коллагена IV типа (KIV); стадию фиброза печени определяли методом непрямо́й эластометрии на аппарате «Fibroscan» («Echosens», Франция). Установлено более высокое накопление в сыворотке крови ГК и KIV при хронических болезнях печени неинфекционной этиологии по сравнению с вирусным процессом с максимальным накоплением их на стадии цирроза печени. Выявлена тесная взаимосвязь данных показателей с показателями тяжести патологического процесса – с активностью воспаления и степенью фиброза в ткани печени, определяемой при непрямо́й эластометрии.

Ключевые слова: фиброз печени, сывороточные маркеры фиброза, неинвазивная диагностика фиброза, дети.

Authors investigated processes of liver fibrosis in 172 children with chronic hepatitis, including viral hepatitis (hepatitis B – VHB and hepatitis C-HVC), autoimmune hepatitis and hereditary liver disease (Wilson's disease). Serological markers of fibrogenesis – hyaluronic acid (HA) and collagen IV type (CIV) were determined in all patients; degree of liver fibrosis was determined by method of indirect elastometry with usage of «Fibroscan» apparatus («Echosens», France). Patients with non-infectious chronic liver diseases showed more high serum HA and CIV in comparison with patients with viral hepatitis, with peak of these markers on the stage of liver cirrhosis. Examination showed correlation of these parameters with severity of pathologic process, i.e. with inflammatory activity and with degree of liver fibrosis according to data of indirect elastometry.

Key words: liver fibrosis, serum markers of fibrosis, noninvasive diagnosis of liver fibrosis, children.

Хронические заболевания печени продолжают оставаться серьезной проблемой гастроэнтерологии. Это определяется многообразием этиологических факторов, тяжестью течения болезни, склонностью к прогрессированию процесса в печени с формированием фиброза (ФП), и в конечном итоге – цирроза (ЦП). В нозологической структуре хронических заболеваний печени у детей существенное место занимает ЦП, обусловленный метаболическими и аутоиммунными причинами. По темпам прогрессирования фибротических изменений паренхимы печени и формирования

цирроза лидируют аутоиммунный гепатит (АИГ) и болезнь Вильсона (БВ) (соответственно 50 и 57,9%) [1]. При вирусном генезе хронического гепатита формирование ЦП наблюдается сравнительно реже, в то же время большая давность заболевания при раннем инфицировании в детском возрасте, высокая вирусемия, сохранение активного воспалительного процесса в ткани печени, ко-инфекция другими гепатотропными вирусами являются факторами ускорения темпов развития ФП. Различная скорость прогрессирования патологического процесса определяется не только

Контактная информация:

Романова Светлана Владимировна – к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела «Клиника патологии верхних отделов пищеварительного тракта у детей» Нижегородского НИИ детской гастроэнтерологии

Адрес: 603095 г. Нижний Новгород, ул. Семашко, 22

Тел.: (831) 436-15-90, E-mail: krigina@mail.ru

Статья поступила 18.05.12, принята к печати 16.06.12.

свойствами инфицирующего агента, но и состоянием макроорганизма. Несомненная роль в определении течения и прогноза вирусных гепатитов (ВГ) принадлежит факторам хозяина. В частности, в ряде работ показана ассоциация различных аллелей полиморфных маркеров генов цитокинов с характером течения хронического ВГС, разным темпом формирования ФП и эффективностью противовирусной терапии [2, 3]. Выявление «протективных» и «профибротических» генотипов у больных ВГ позволяет определить прогноз заболевания и выделить категорию пациентов, угрожаемых по формированию ЦП.

Процесс фиброгенеза в печени связан с индукцией поврежденными гепатоцитами активности макрофагов и эндотелия синусоидов, что ведет к стимуляции звездчатых клеток. Независимо от генеза поражения печени – при вирусных инфекциях, врожденных дефектах метаболизма, токсическом гепатите происходит активация клеток Ито [4]. При этом большое значение в запуске фиброзного процесса и микроваскулярного повреждения в настоящее время придается нарушениям Т-клеточных реакций [5]. В исследованиях *in vitro* установлена способность медиаторов иммунных клеток – цитокинов изменять функциональную активность фибробластов, в том числе рост, проли-

ферацию и продукцию компонентов межклеточного матрикса [6]. Большинство цитокинов стимулирует продукцию компонентов экстрацеллюлярного матрикса, за исключением интерлейкина 10 (IL10), интерферонов (ИФН) α и γ , которые депрессируют его синтез. Кроме этого, регуляторными субстанциями, принимающими участие в активации, пролиферации и миграции клеток Ито, являются трансформирующий фактор роста β (TGF β), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), а также факторы роста соединительной ткани и фибробластов. Активированные под влиянием цитокинов (IL1, 6, TNF α), оксида азота, эндотелина звездчатые клетки трансформируются в миофибробласты и начинают вырабатывать основные компоненты межклеточного матрикса – структурные белки коллагена, эластин, гликозаминогликаны, протеогликаны, неколлагенные структурные белки – фибронектин, ламинин, тенасцин, остеонектин с нарушением соотношения между фибротическими и антифибротическими факторами [7], а также продуцируют ряд хемокинов, усиливающих миграцию мононуклеаров и нейтрофилов в зоны повреждения печени [5, 8]. Смещение этого равновесия ведет к изменению состава экстрацеллюлярного матрикса с уменьшением уровня антифибротических компонентов, участвующих в разрушении белков меж-

клеточного матрикса, прежде всего, матриксных металлопротеиназ (ММП) 2-го, 9-го типов [9] и накоплению коллагена I, III, IV типов, эластина, гликозамингликанов, протеогликанов, ламинила, фибронектина в пространстве Диссе [4, 10].

В последние годы у взрослых пациентов при хронических заболеваниях печени вирусного генеза изучаются изменения содержания сывороточных показателей и их зависимость от стадии ФП [11–14]. Среди сывороточных маркеров фиброза рассматриваются ММП 1, 2, 9 и их эндогенные ингибиторы – тканевые ингибиторы ММП (TIMP-1, TIMP-2), коллаген I, IV и VI типов, гиалуроновая кислота (ГК), α_2 -макроглобулин, общий билирубин, TGF β , PDGF, а также лизосомные ферменты сыворотки крови [12]. Имеются работы, свидетельствующие о наибольшей значимости ММП и их тканевых ингибиторов [12, 15].

В то же время рядом авторов доказано, что наиболее информативными серологическими маркерами фиброобразования являются ГК и коллаген IV типа (KIV) [11, 16]. Полученные результаты указывают на существенную роль ГК в печеночном фиброгенезе. ГК – гликозаминогликан, продуцируемый фибробластами, присутствует в экстрацеллюлярном матриксе печени и повышается в сыворотке пациентов при формировании фиброза. Выявлена диагностическая значимость ГК как маркера тяжелого фиброза при неалкогольной жировой болезни печени [17]. Коллаген, являясь полиморфным фибриллярным белком, составляет основу межклеточного матрикса. При этом коллаген I, III и V типов представлен преимущественно в коже, сухожилиях, костях, печени, роговице, артериях, дентине и составляет фибриллярный матрикс, а коллаген IV, VI, XIV и XVIII типов является основным компонентом матрикса, свойственного базальным мембранам. Разные типы коллагена или продукты его распада появляются в сыворотке в результате метаболических процессов мембран [18].

В отечественной и зарубежной литературе работы, посвященные изучению процессов фиброгенеза в детском возрасте, немногочисленны и преимущественно касаются вирусных поражений печени. В исследованиях, проведенных у детей, показано различие ГК и KIV при ЦП и хроническом гепатите, в то время как по содержанию ММП2, TIMP-1 и TGF β 1 изменений не получено [19, 20]. Имеются работы, изучающие содержание ламинина 2 и ГК при хроническом гепатите B [21, 22]. В связи с этим актуально исследование зависимости показателей фиброгенеза от стадии, тяжести и этиологии поражения печени для понимания механизмов фиброгенеза при хронических заболеваниях печени у детей.

Цель исследования – совершенствование диагностики ФП у детей с хроническими гепатитами и ЦП вирусной и неинфекционной этиологии на

основе изучения изменения уровня сывороточных показателей фиброза и результатов непрямо́й эластометрии печени.

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находились 172 ребенка, в том числе с хроническими ВГ – 132 пациента (хронический ВГС – у 77, хронический ВГВ – у 55), с хроническими гепатитами неинфекционного генеза – 40 детей (АИГ – у 23 детей, БВ – у 17 больных).

Обследование пациентов включало клиническое наблюдение, общий и биохимический анализы крови, определение маркеров ВГ (B, C) методами иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции, определение аутоантител, церулоплазмينا и уровня экскреции меди с мочой, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, ультразвуковую доплерографию сосудов печени и портальной системы, морфологическое исследование образцов ткани печени, полученных путем пункционной или интраоперационной биопсии.

Инструментальную оценку степени фиброза проводили на аппарате «Fibroscan» («Echosens», Франция) с разграничением стадии по шкале Metavir от F0 до F4. При проведении непрямо́й эластометрии печени оценивается скорость распространения импульсных низкочастотных ультразвуковых колебаний в ткани печени, эластичность которой зависит от выраженности фиброза. Метод позволяет исследовать участок печени величиной 1x4 см, что снижает неоднородность образцов. Исследование отличается высоким совпадением результатов при выполнении одним и тем же (96–98%) и разными (89–98%) специалистами. Препятствиями к выполнению эластометрии могут стать ожирение, узость межреберных промежутков, тяжелая атрофия печени и асцит.

Исследование проводили в положении пациентов на спине с максимальным отведением правой руки. Трансдюсер датчика устанавливали в VI–VIII межреберьях по срединно-подмышечной линии в проекции правой доли печени. Точную установку датчика проводили с помощью окна ультразвуковой визуализации. Исследование проводили на участке печени, свободном от сосудистых структур, диаметром более 5 мм, однородной структуры. Зона фокусировки датчика – 25–65 мм от поверхности кожи. В соответствии с рекомендациями производителя выполняли 10 достоверных замеров, по результатам которых программой вычисляли результирующую величину эластичности печени. Полученную величину выражали в килопаскалях (кПа).

В качестве сывороточных маркеров фиброза оценивали содержание в сыворотке крови ГК методом ИФА с использованием тест-систем Hyaluronic acid Test Kit (Corgenix Inc., США), KIV – при помощи тест-систем Biotrin Serum Collagen IV EIA (Biotrin International Ltd., Ирландия). В качестве маркеров повреждения гепатоцитов исследовали активность аланиновой аминотрансферазы (АЛАТ) оптимизированным УФ-тестом

(«DiaSys», Германия) с помощью биохимического анализатора «Fuguo SA-180», концентрацию аргиназы – методом ИФА при помощи набора «Аргиназа печени (сыворотка, ликвор), 96» («Bio Vendor», Чехия).

Обработку полученного материала выполняли в соответствии с общепринятыми современными методами статистического анализа, интегрированными в ряде прикладных программ – Statistica 6.0 for Windows XP, «Биостат» for Windows XP, Excel for Windows XP. Описательная статистика признака включала среднее значение (M), ошибку средней величины (m). Для сравнения показателей между группами использовали критерии Стьюдента, Фишера, χ^2 , Манна-Уитни для несвязанных групп. Различия считали достоверными при достигнутом уровне значимости соответствующего статистического критерия $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Среди всех наблюдаемых детей с хроническими гепатитами и ЦП признаки формирования фиброза различной степени (F1–F4 по Metavir) по данным непрямой эластометрии печени были выявлены у 27,9% детей. Так, отсутствие фиброза (F0) было выявлено у 124 детей, фиброз F1 – у 18 больных, F2 – у 12 детей, F3 – у 7 пациентов, ЦП F4 диагностирован у 11 детей. Средний показа-

тель эластичности ткани печени по данным эластометрии соответствовал $6,76 \pm 0,45$ кПа, при этом для фиброза F0 он равнялся $4,62 \pm 0,07$ кПа, для F1 – $6,42 \pm 0,12$ кПа, для F2 – $8,16 \pm 0,21$ кПа, для F3 – $10,30 \pm 0,70$ кПа, для F4 – $23,19 \pm 2,73$ кПа.

Наиболее часто продвинутые стадии ФП были выявлены при неинфекционной этиологии заболевания – при АИГ стадии фиброза F3–F4 диагностированы в 56% случаев, при этом у 43% больных заболевание выявлено на стадии ЦП; при ВВ фиброз F3–F4 составил 12% всей группы. В то же время хронические ВГ сопровождались формированием фиброза существенно реже – у 11,3% больных на стадии F1–F2 ($\chi^2=10,6$; $p=0,001$).

Концентрации ГК и KIV в сыворотке крови наблюдаемых больных представлены в табл. 1–3.

Существенных различий содержания компонентов экстрацеллюлярного матрикса в зависимости от возбудителя ВГ (В и С) не выявлено ($p > 0,05$) (рис. 1). В то же время наличие репликативной активности вирусов гепатита было ассоциировано со статистически значимым повышением концентрации ГК в сыворотке крови ($p=0,006$) (рис. 2), что может быть связано со способностью белков вирусов гепатита В и С стимулировать фиброгенетическую активность клеток Ито,

Таблица 1

Изменение показателей ГК и KIV в сыворотке крови детей с хроническими гепатитами в зависимости от этиологии заболевания

Показатели	Хронические ВГ (n=132)	Хронические гепатиты неинфекционной этиологии (n=40)
ГК, нг/мл	$16,36 \pm 1,46$	$153,23 \pm 30,72$ ($p=0,000$)
KIV, нг/мл	$193,16 \pm 9,71$	$238,32 \pm 17,03$ ($p=0,025$)

Таблица 2

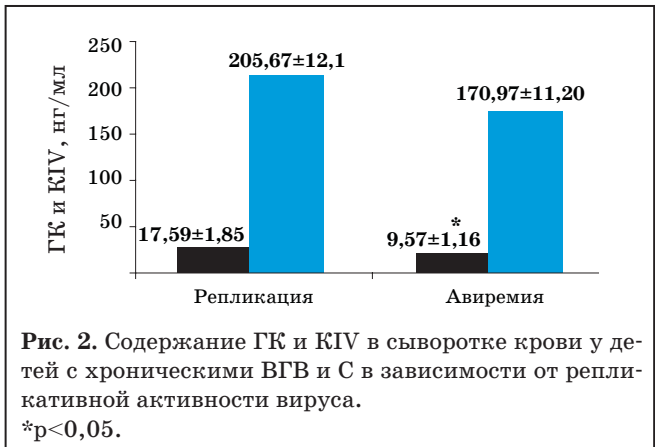
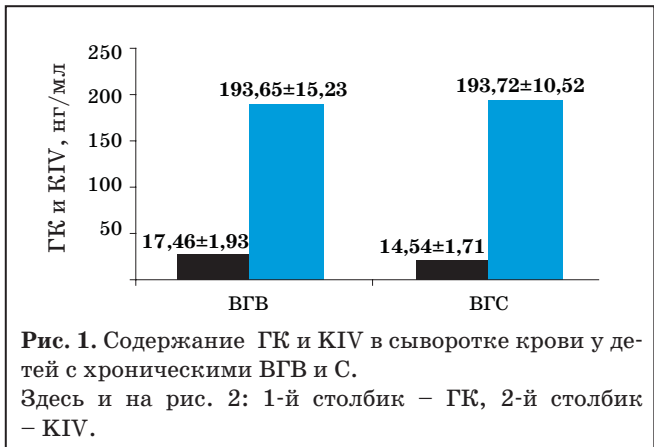
Уровень ГК и KIV в сыворотке крови детей с хроническими гепатитами неинфекционной этиологии в зависимости от наличия ЦП

Показатели	Хронические гепатиты неинфекционной этиологии (n=40)	
	с наличием ЦП (n=11)	без признаков ЦП (n=29)
ГК, нг/мл	$287,40 \pm 27,33$	$19,07 \pm 7,1$ ($p=0,000$)
KIV, нг/мл	$297,62 \pm 24,81$	$201,61 \pm 19,23$ ($p=0,003$)

Таблица 3

Уровень ГК и KIV в сыворотке крови детей с хроническими гепатитами неинфекционной этиологии в зависимости от наличия ФП

Показатели	Хронические ВГ (n=132)	
	с наличием ФП (n=15)	без ФП (n=117)
ГК, нг/мл	$23,86 \pm 4,77$	$14,99 \pm 1,26$ ($p=0,018$)
KIV, нг/мл	$224,23 \pm 34,31$	$185,68 \pm 7,29$



приводя к более выраженному изменению состава экстрацеллюлярного матрикса с накоплением полисахаридов.

Вместе с тем, выявлены различия уровней сывороточных показателей процесса фиброгенеза в зависимости от этиологии хронического гепатита у детей (табл. 1). Так, хронические болезни печени неинфекционной этиологии характеризовались существенно более высоким накоплением в сыворотке крови ГК и КIV в отличие от гепатитов вирусного генеза (p=0,000; p=0,025). Данные различия можно объяснить более высокими темпами прогрессирования АИГ и БВ у детей по сравнению с ВГ, при которых формирование ФП происходит в более поздние возрастные периоды.

В то же время уровень показателей фиброза увеличивался параллельно нарастанию тяжести патологического процесса в печени с наибольшей выраженностью на стадии цирроза (табл. 2). У наблюдаемых нами детей с хроническими болезнями печени неинфекционного генеза уровень ГК у больных с фиброзом на стадии F4 достоверно отличался от такового у пациентов при отсутствии ЦП (p=0,000). Однонаправленные изменения мы отмечали и по содержанию в сыворотке крови КIV – максимальная его концентрация в крови регистрировалась у детей с циррозом – 297,62 ± 24,81 нг/мл и существенно превышала значения больных без признаков ЦП (p=0,000).

При хронических вирусных поражениях печени прослеживалась та же тенденция – формирование фиброзного процесса в ткани печени сопровождалось статистически значимым возрастанием значений ГК в сыворотке крови (p=0,018) и более высоким уровнем КIV по сравнению с группой пациентов с фиброзом F0 (табл. 3).

Депонирование в пространстве Дриссе коллагеновых структур и гликозаминогликанов четко ассоциировалось с увеличением плотнос-

ти ткани печени, выявляемой при проведении непрямой эластометрии. При хронических гепатитах вирусного генеза регистрировалась связь величины эластичности печени и показателя ГК (R=0,506, p=0,007), а при АИГ и БВ – с уровнем ГК (R=0,806, p=0,000) и концентрацией КIV (R=0,401, p=0,018).

Зависимость от тяжести поражения печени при хронических болезнях печени подтверждалась достоверной корреляционной прямой связью ГК с маркером поражения печени – АЛТ (R=0,330, p=0,008) и обратной корреляцией с уровнем аргиназы в крови – фермента, участвующего в синтезе коллагена и полиаминов и одного из ранних маркеров повреждения и регенераторных процессов в ткани печени (R=-0,754, p=0,030).

Заключение

Сывороточные показатели ГК и КIV в сыворотке крови у детей с хроническими заболеваниями печени тесно сопряжены с показателями тяжести патологического процесса – с активностью воспаления и степенью фиброза в ткани печени. При этом у детей с хроническими гепатитами неинфекционного генеза уровень сывороточных маркеров фиброза достоверно превышает таковой при ВГ, при наличии ЦП регистрируются максимальные значения компонентов межклеточного матрикса в сыворотке крови.

Различные темпы прогрессирования процесса при хронических заболеваниях печени у детей могут быть связаны с индивидуальными особенностями организма, в частности, с наличием генетического полиморфизма. Непосредственное участие цитокинов в активации stellatных клеток и избыточном синтезе белков соединительной ткани определяет перспективность исследования влияния полиморфизмов генов интерлейкинов на механизмы формирования фиброза при хронических заболеваниях печени в детском возрасте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Учайкин В.Ф., Чуелов С.Б., Россина А.Л. и др. Циррозы печени у детей. Педиатрия. 2008; 87 (5): 52–58.
 2. Абдуллаев С.М. Клиническое значение полиморфизма

генов цитокинов и гена гемохроматоза у больных хроническим гепатитом С: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2008.
 3. Tag CG, Mengsteab S, Hellerbrand C, et al. Analysis of

the transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with chronic hepatitis C infection. *Cytokine*. 2003; 24 (5): 173–181.

4. Braet F, Luo D, Spector I, et al. Endothelial and Pit Cells in the Liver. In: *Biology and Pathobiology*. 4th ed. Eds. Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, et al. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia PA, 2001: 437–453.

5. Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin. Sci*. 2007; 112: 265–280.

6. Knittel T, Kobold D, Saile B, et al. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology*. 1999; 117: 1205–1221.

7. Zeisberg M, Yang C, Martino M, et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem*. 2007; 282 (23): 337–347.

8. Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis: pathogenesis and principles of therapy. *Clin. Liver Dis*. 2001; 5: 315–334.

9. Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2007; 22 (1): 79–84.

10. Beaugrand M. Liver stiffness measurement: new tool to assess liver fibrosis. EASL Single Topic Conference on The role of liver biopsy in diagnosis and management of chronic liver disease. Torino, Italy, 2004: 513–514.

11. Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, et al. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol*. 2001; 36: 399–406.

12. Leroy V, Monier F, Bottari S, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am. J. Gastroenterol*. 2004; 99: 271–279.

13. Sieber SA, Niessen S, Hoover HS, et al. Proteomic profiling of metalloprotease activities with cocktails of active-site probes. *Nat. Chem. Biol*. 2006; 2 (5): 274–281.

14. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, et al. Evaluation of a panel of noninvasive serum markers to differentiate mild from moderate to advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J. Hepatol*. 2004; 41: 935–942.

15. Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clin. Chem*. 2000; 46 (2): 183–192.

16. Chen YP, Feng XR, Dai L, et al. Screening and evaluation of noninvasive diagnosis markers for compensated liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua. Gan. Zang. Bing. Za. Zhi*. 2003; 11: 225–227.

17. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver. Int*. 2005; 25: 779–786.

18. Marks V, Cantor T, Mesko D, et al. Differential diagnosis by laboratory medicine. Springer Verlag, 2002: 319–320.

19. Сурков А.И., Смирнов И.Е., Кучеренко А.Х. и др. Динамика маркеров фиброобразования при хронических болезнях печени у детей. *Рос. пед. журнал*. 2009; 3: 23–27.

20. Чуелов С.Б., Россина А.Л., Чередниченко Т.В. и др. Сывороточные маркеры фиброза печени у детей: диагностическое и прогностическое значение. *Педиатрия*. 2008; 87 (6): 67–73.

21. Lebensztejn DM, Kaczmarzski M, Sobaniec–Lotowska M, et al. Serum laminin-2 and hyaluronan predict severe liver fibrosis in children with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2004; 39: 868–869.

22. Lebensztejn DM, Sobaniec–Lotowska ME, Bauer M, et al. Serum fibrosis markers as predictors of an antifibrotic effect of interferon alfa in children with chronic hepatitis B. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*. 2005; 17: 843–848.