

На правах рукописи



АБДРАШИТОВ РАДИФ ФАРИТОВИЧ

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ
НЕИНВАЗИВНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ФИБРОЗА
У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ**

14.00.05 – внутренние болезни

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук**

Томск – 2006

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Белобородова Эльвира Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,

Заслуженный деятель науки РФ Тепляков Александр Трофимович

доктор медицинских наук, доцент

Гибадулина Ирина Олеговна

Ведущая организация: Новосибирский государственный медицинский университет

Защита состоится « 9 » июня 2006 года в « ____ » час. на заседании диссертационного совета Д 208.096.02. при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (г.Томск, пр-т Ленина, 107).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2006 года

Ученый секретарь

диссертационного совета



Тюкалова Л.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, более 350 млн. человек во всех странах мира инфицированы вирусами гепатитов (Материалы ВОЗ, 2000), что характеризует глобальность этой проблемы не только в медицинском, но и социальном аспекте. От патологий, связанных с вирусными гепатитами, ежегодно в мире умирают около 2 млн. человек (Koff R., 1996). Развитие цирроза печени у больных хроническим вирусным гепатитом «В» происходит в 10-60% случаев (Perillo R.P, et al.,1990), а при хроническом вирусном гепатите «С» – в 20-50% случаев (Olynyk J.K., Bacon B.R.,1995, Dienstag J.,1995, Kage M. Et al., 1997). Доказана роль вирусных гепатитов в развитии гепатоцеллюлярной карциномы. По последним данным, вирусный гепатит «С» является причиной гепатокарциномы в 15-20% (Estebahn J.L. et al. 1996, Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S et al. 1995), вирусный гепатит «В» – в 15%, сочетание вирусных гепатитов «В» и «С» – в 27 % случаев (Tabor E., Kobayashi K., 1994).

Важным компонентом в диагностике хронического гепатита является установление его стадий. Определение их важно для выбора тактики лечения и уточнения прогноза заболевания. Согласно современной классификации хронических гепатитов (Лос-Анджелес, 1994) стадия определяется гистологически по распространённости фиброза и развитию цирроза (R. Knodell et al., 1981, J. Sciote, V. Desmet 1994, P. Schuener, 1981). В последнее время появилось небольшое число работ, посвящённых неинвазивным способам оценки фиброза печени. Приоритет в данном направлении отдаётся маркерам фиброгенеза в сыворотке крови: гиалуроновая кислота, металлопротеиназа, проколлаген, ламинин (Holoman J., Glasa J., 2002, Kozłowska J., Loch T., Jabłonska J., 2001, Wang T., Wang B., Liu. X. 1998. В литературе нет работ, посвящённых комплексной оценке биохимических показателей внеклеточного матрикса у больных хроническим вирусным гепатитом, где бы учитывались все звенья, участвующие в метаболизме коллагена (коллагеназа, ее ингибиторы протеиназ [α 2-макроглобулин, α 1-протеиназный ингибитор], продукты метаболизма коллагена [фракции оксипролина]). Отсутствуют работы, посвященные возможности использования определения фибронектина в плазме крови для не-

инвазивной диагностики фиброза у больных ХВГ. Не проводилось сопоставление биохимических показателей ВКМ с гистологической картиной фиброза печени у больных ХВГ. Не изучались эти неинвазивные методы исследования при различных этиологических вариантах ХВГ. Отсутствуют работы, в которых бы указывалась значимость комплексной оценки стадии хронизации неинвазивными методами исследования у больных хроническим вирусным гепатитом в прогнозировании цирроза печени.

Цель исследования.

Изучить возможность использования ингибиторов протеиназ (α 2-макроглобулин, α 1-протеиназный ингибитор), коллагеназы, продуктов метаболизма коллагена (фракции оксипролина), фибронектина в качестве неинвазивных маркеров фиброза печени у больных ХВГ.

Задачи исследования

1. Определить диагностическую значимость сывороточных маркеров фиброза у больных хроническим вирусным гепатитом путем изучения коллагенолитической активности крови, активности ингибиторов протеаз, продуктов деградации коллагена.

2. Изучить взаимосвязь гистологически выявленной степени активности хронического вирусного гепатита с показателями сывороточных маркеров фиброза.

3. На основании полученных в ходе исследования данных разработать биохимические критерии стадий хронизации вирусных гепатитов (неинвазивный мониторинг фиброза печени)

4. Исследовать роль фибронектина в сыворотке крови как диагностического маркера фиброгенеза в течении вирусных гепатитов.

5. Изучить возможность применения комплексной оценки стадий хронизации вирусных гепатитов в прогнозировании цирроза печени.

Научная новизна работы

Впервые произведено комплексное обследование больных хроническим вирусным гепатитом В, С, В+С, где наряду с серологическим исследованием крови, проведением полимеразной цепной реакции и оценкой биохимических показателей активности воспалительного процесса в печени реализовано мор-

фологическое исследование биоптатов печени, определены сывороточные маркеры фиброза. Новой является разработка неинвазивной диагностики стадий хронизации вирусного гепатита и диагностика цирроза печени. Доказана диагностическая и прогностическая ценность определения фибронектина в сыворотке крови для оценки стадий фиброза печени.

Практическая значимость

В процессе выполнения работы внедрена комплексная диагностика хронических вирусных гепатитов, включающая численную морфологическую характеристику биоптатов печени и определение сывороточных маркеров фиброза (коллагенолитическая активность, продукты деградации коллагена, активность ингибиторов протеаз, концентрация фибронектина). Это позволило внедрить неинвазивные методы исследования в диагностику стадий хронизации вирусных гепатитов и цирроза печени. Использование сывороточных маркеров фиброза дает возможность применять их в лечебном процессе для контроля за противовирусной терапией.

Внедрение результатов работы

Результаты исследования внедрены в лечебно – диагностический процесс отделения гастроэнтерологии и отделения дневного стационара областной клинической больницы города Томска, в учебный процесс кафедры терапии ФПК и ППС и кафедры госпитальной терапии СибГМУ. По результатам работы получено 2 патента на изобретение (№ 2244306 от 10.01.2005 и № 2270451 от 20.02.2006), оформлено 2 заявки на изобретение с приоритетом № 2004123226 от 4.03.2004 и № 200412393 от 4.08.2004.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Коллагенолитическая активность сыворотки у больных хроническим вирусным гепатитом в фазе репликации вирусной инфекции достоверно повышается при нарастании степени фиброза в биоптатах печени, активность α_2 -макроглобулина достоверно снижается уже при 1 степени фиброза и остается низкой при дальнейшем нарастании хронизации процесса (2,3 степени фиброза). Активность α_1 – протеиназного ингибитора в сыворотке крови достоверно снижается при нарастании степени фиброза. Исследование концентрации свободного оксипролина (продукт деградации коллагена) в сыворотке крови показывает повышение этого показателя в 2 раза уже при 1 степени достоверное

нарастание с прогрессированием степени фиброза. Концентрация белково-связанного оксипролина остается повышенной при 2, 3 степенях фиброза, а при 4 степени (циррозе печени) нарастает более чем в 2 раза.

2. Содержание фибронектина в сыворотке крови у больных хроническим вирусным гепатитом в фазе репликации вирусной инфекции достоверно снижается и отмечается обратная корреляционная зависимость от стадии хронизации процесса по данным гистологической картины биоптатов печени.

Апробация работы

Результаты работы обсуждались на 10, 12, 13-й научно-практических конференциях «Достижения современной гастроэнтерологии» (г. Томск, 2002, 2004, 2005); второй, третьей, четвертой областной научно-практических конференциях «Хронические гепатиты. Диагностика и лечение. Достижения и перспективы» (г. Томск, 2002, 2004, 2005); девятой, десятой и одиннадцатой Российской конференции «Гепатология сегодня» (г. Москва 2004, 2005, 2006), на проблемной комиссии «Внутренние болезни» (г. Томск, 2002 г.) и заседании экспертной комиссии по внутренним болезням Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск, 2006 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, 4-х глав, выводов, практических рекомендаций, библиографического указателя литературы, который включает 123 отечественных и 87 иностранных источников. Диссертация изложена на 100 страницах формата А4, содержит 15 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проводилась на кафедре терапии ФПК и ППС Сибирского государственного медицинского университета (зав. кафедрой – д-р мед. наук, профессор Белобородова Э.И.) на базе отделения гастроэнтерологии областной клинической больницы г. Томска (главный врач Серых Б.Т.). Биохимические исследования проводились совместно с сотрудниками кафедры биохимии СибГМУ (зав. кафедрой – д-р мед. наук, профессор Серебров В.Ю.).

В настоящую работу было включено 92 пациента (58 мужчин и 34 женщин) в возрасте от 18 до 50 лет, средний возраст $34,28 \pm 1,85$ лет с хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени. Все пациенты проживали в Томской области.

По этиологическому принципу больные были разделены следующим образом: хронический гепатит В – 16 человек, хронический гепатит С - 62 человек, хронический гепатит В+С – 14 человек. Длительность заболевания хроническим вирусным гепатитом составила от 1 года до 16 лет, в среднем составила $8,2 \pm 1,9$ лет. Все группы больных были сопоставимы по полу, возрасту, давности заболевания.

До момента обследования пациенты не получали полных курсов стандартной противовирусной терапии препаратами интерферона.

Все больные не находились на учете у нарколога, но у части из них в анамнезе были эпизоды внутривенного введения наркотических препаратов, не превышающие 3-х месяцев, на момент обследования абстиненция была более 6 месяцев. Клинически и анамнестически у больных были исключены употребление алкоголя, гепатотоксических веществ.

У всех больных хроническим гепатитом была диагностирована репликативная фаза вирусной инфекции. Диагноз хронического вирусного гепатита устанавливался при наличии соответствующих клинических, клинико - инструментальных (гепатомегалии, спленомегалии), и лабораторных синдромов: синдромов цитолиза (повышение в сыворотке крови АЛТ, АСТ, гамма – ГТП), холестаза (повышение в сыворотке крови концентрации билирубина, щелочной фосфатазы), мезенхимально-воспалительного (повышение в сыворотке крови тимоловой пробы, гамма – глобулинов) и персистенции в крови 6 и более серологических маркеров HBV (HbsAg, HbeAg, анти – HbcorAg Ig M и IgG, анти Hbcor суммарные) и HCV (анти – HCV IgM, Ig G, антитела к неструктурным белкам(NS3, NS4, NS5), ДНК HBV и HCV, определяемых методом ПЦР.

Всем пациентам проводилось морфологическое подтверждение диагноза путем пункционной биопсии печени либо биопсии печени при диагностической лапароскопии с установлением степени активности и стадии хронизации процесса.

В зависимости от морфологически диагностированной стадии гепатита все пациенты были разделены на 4 клинические группы.

Первая группа была представлена 26 пациентами, у которых была диагностирована 1 стадия хронизации гепатита – слабый фиброз (фиброз и расширение портальных трактов).

Вторая группа – 24 больных со 2 стадией хронизации. – умеренный фиброз (перипортальный фиброз).

Третья группа – 23 больных с 3 стадией хронизации гепатита – тяжёлый фиброз (портал – центральные септы).

Четвертая группа – 21 пациент с морфологически подтвержденным циррозом печени (4 стадия хронизации гепатита).

Группу контроля составили 30 практически здоровых лиц.

Больным проводилось стандартное общеклиническое обследование, принятое в гастроэнтерологической практике, включающее сбор анамнеза, физикальное обследование, клинический анализ крови, мочи, биохимический анализ крови, коагулограмму, инструментальные методы исследования.

Изучение белоксинтетической функции печени заключалось в определении общего белка сыворотки крови биуретовым методом, а также белковых фракций (альбумины, глобулины α_1 , α_2 , β , γ) унифицированным методом электрофоретического разделения.

Синдром цитолиза определялся по активности в сыворотке крови АЛТ, АСТ, унифицированным методом по оптическому тесту наборами для кинетических определений фирмы «Лахема» (Чехия). Уровень γ -ГТП определялся колориметрическим методом по «конечной точке» реактивами фирмы «Лахема». Нормативные показатели АСТ, АЛТ, γ -ГТП для нашей лаборатории – до 40 МЕ/л. Уровень щелочной фосфатазы определялся кинетически наборами фирмы «Лахема», нормативные показатели для нашей лаборатории – до 120 МЕ/л. Определение уровня общего билирубина и его фракций в сыворотке крови проводилось по методу Ендрассика – Клеггорна – Грофа. Норма общего билирубина – до 20,5 мкмоль/л. Синтетическую функцию печени также характеризовали протромбиновый индекс, определявшийся методом Квика и общий фибриноген, определявшийся унифицированным методом Рутберга.

Оценка мезенхимально-воспалительного синдрома проводилась по уровню тимоловой, чувствительной к повышению глобулинов по отношению к альбуминам, а также к изменениям содержания липидов. Серологические маркеры вирусных гепатитов определялись методом ИФА, тест – наборами НПО «Диагностические системы» (г. Нижний Новгород).

Верификация этиологии и репликативной фазы развития вируса гепатита проводилась методом ПЦР-диагностики наборами НПФ «Литех», г. Москва. ПЦР-диагностика проводилась в г. Томске НПО «Вирион».

Ультразвуковое исследование брюшной полости проводилось на аппарате фирмы «Аloka». Эндоскопические методы исследования (эзофагогастродуоденоскопия, лапароскопия) проводились с использованием аппаратуры фирмы «Olympus».

Биоптаты печени получали методом чрезкожной пункционной биопсии. Забор материала осуществлялся после исключения всех абсолютных и относительных противопоказаний и предварительного общеклинического исследования пациентов с обязательным контролем основных показателей гемостаза. Для получения биоптата использовался одноразовый набор «Нераfix» фирмы «Braun» (ФРГ) с внутренним диаметром от 1,4 до 1,8 мм и длиной иглы 88 мм. Препараты готовились по стандартной методике, заливались в парафин. Срезы толщиной 5-6 мкм исследовались с помощью следующих гистологических методик: окраска гематоксилином и эозином, окраска пикрофуксином по Ван-Гизону коллагеновых волокон соединительной ткани стромы печени, окраска пиронином по Браше на РНК и ДНК, ШИК-реакция по Мак-Манусу на гликоген и гликопротеиды, окраска на жир суданом-3

Статистическая обработка

В работе использовался персональный компьютер IBM с процессором Intel Celeron. Математические методы реализованы с помощью средств, предоставляемых электронными таблицами Microsoft Excel 2002 и программой Statistica 6.0 Проверка нормальности проведена с помощью показателей асимметрии и эксцесса. Распределение при знаков во всех подгруппах не подчинялось законам нормального распределения, поэтому результаты исследований обрабатывались методом вариационной статистики, проводились дискриминантный и корреляционный анализы. Условные обозначения статисти-

ческих параметров в тексте и в таблицах представлены следующим образом: n - объем выборки, M - средняя арифметическая, p - величина показателя в долях единицы или в расчете на 100, 1000, 10000 и т.д., m - ошибка репрезентативности (средняя ошибка для средних или относительных величин), R - коэффициент корреляции, F - критерий Фишера, U - критерий Уилкоксона (Манна-Уитни), P - доверительная вероятность (уровень значимости). Набор и корректировка текста, графические изображения выполнены с помощью программы Microsoft Word 2002. Распечатка производилась на принтере HP LaserJet 1010.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хронизация диффузных поражений печени определяется прежде всего избыточным образованием и накоплением фиброзной ткани в органе. Именно этот процесс лежит в основе пато- и морфогенеза хронического гепатита и цирроза с вытекающими отсюда серьезными неблагоприятными последствиями, важнейшими из которых являются нарушения в органе микроциркуляторного кровообращения. Ключевым процессом в инволюции хронических склеротических изменений печени является резорбция фиброзной ткани, основным компонентом которой является коллаген. Распад коллагена в печени инициируется и осуществляется внеклеточно коллагеназой (не влияющей на другие фибриллярные и глобулярные белки), а затем частично распавшийся коллаген поглощается и лизируется макрофагами. Относительно специфичности коллагенолитической активности для контроля процессов фиброгенеза именно в печени в ряде литературных источников высказывались сомнения, так как на содержание коллагеназы в сыворотке крови может влиять метаболизм коллагена в других органах (кожа, кости). Однако скорость кругооборота коллагена в печени во время активной фиброплазии гораздо выше, чем в других органах, где коллагеновые массы остаются устойчивыми, пока отсутствует заболевание. При анализе коллагенолитической активности крови у больных хроническими вирусными гепатитами нами были получены данные, указанные в таблице № 1.

Таблица 1

Коллагенолитическая активность крови у больных хроническими вирусными гепатитами с учетом стадии хронизации

Стадия хронизации	Контроль	1	2	3	4
Активность коллагеназы, мкмоль/(л·ч)	1,27±0,046	2,19±0,042 * p 1-2<0,05	3,23±0,064 * p 2-3<0,05	3,49±0,06 * p 3-4<0,05	4,06±0,07 *

* - достоверное изменение по сравнению с контролем (p<0,05)

Активность коллагеназы в сыворотке крови была достоверно (p<0,05) повышена по сравнению с контролем у пациентов со всеми этиологическими вариантами ХВГ и цирроза печени. Также при анализе полученных данных выявлены достоверные (p<0,05) различия среди пациентов с различной стадией хронического гепатита. Средний уровень активности коллагеназы при 2 стадии хронизации был у 86 % больных в 1,5 раза выше, чем при первой, что позволяет дифференцировать данные стадии между собой. Активность коллагеназы достоверно не отличалась при 2 и 3 стадиях (p<0,05). При сравнительном анализе различий между больными с 3-й и 4-й (цирроз печени) стадиями хронизации также были получены достоверные результаты – при циррозе печени концентрация исследуемого нами фермента были достоверно выше в 1,3 (p<0,05) у 82 % больных, чем при хроническом гепатите 3-й стадии хронизации. По сравнению с группой контроля уровень коллагенолитической активности в группе больных циррозом печени был в 2,8 раза выше (p<0,05).

Для исследования взаимоотношений стадий хронического воспалительного процесса в печени и активности коллагеназы в сыворотке крови был проведен корреляционный анализ, который показал наличие прямой корреляционной связи средней силы (R=0,58).

Полученные нами данные свидетельствует о том, что прогрессирование процессов фиброгенеза в печени вызывает повышение активности коллагеназы, направленное на резорбцию избыточного образования коллагена. Изучение содержания коллагеназы в сыворотке крови позволяет, согласно нашего исследования выявлять наличие хронизации гепатита вообще, а также диффе-

ренцировать стадии течения заболевания между собой: первую и вторую, а также третью и четвертую.

Таким образом, наше исследование позволяет предложить метод неинвазивной диагностики стадий хронизации вирусного гепатита, а также способ выявления закономерного исхода вирусного гепатита – цирроза печени.

Принимая во внимание регулирующие влияние ингибиторов протеаз на коллагенолитическую активность крови нами был проведен их анализ в сыворотке крови у больных хроническим вирусным гепатитом.

По данным литературы α 2-макроглобулин является ингибитором коллагеназы, следовательно, он может представлять собой предмет оценки стадии хронизации вирусного гепатита.

Таблица 2

Активность α 2-макроглобулина у больных хроническими вирусными гепатитами с учетом стадии хронизации

Стадия хронизации	Контроль	1	2	3	4
Активность α 2-макроглобулина, ИЕ/мл	3,89±0,12	2,08±0,23	3,25±0,23	2,98±0,37	1,93±0,17
		*	*	*	*

* - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

По нашим данным активность α 2-макроглобулина снижается более чем в 1,5 раза у 84 % больных при I стадии хронизации гепатита, что вполне объяснимо и носит достоверный характер (3,86±0,12 ИЕ/мл в группе контроля, и 2,08±0,23 ИЕ/мл при I стадии, $p < 0,05$).

Однако дальнейший анализ этого показателя при нарастании стадий фиброза не выявил определенной закономерности – при II и III степенях фиброза выявлена только склонность к повышению данных показателей. Поэтому можно сделать заключение, что α 2-макроглобулин не может служить маркером данных стадий хронизации гепатита. В то же время возможно его использование как диагностического критерия наличия цирроза печени – в группе больных с данной патологией в 79 % случаев отмечается снижение активности

α 2-макроглобулина практически в 2 раза по сравнению с группой контроля ($3,86 \pm 0,12$ и $1,93 \pm 0,17$ ИЕ/мл, $p < 0,05$).

Исследование активности α 1-протеиназного ингибитора в сыворотке крови показало отчетливое снижение данного показателя с нарастанием степени фиброза. Анализируя приведенные в таблице 3 данные можно отметить существенное достоверное ($p < 0,05$) снижение данного ингибитора протеаз уже на I стадии хронизации гепатита в практически в 1,5 раза по сравнению с группой контроля ($19,25 \pm 0,33$ и $26,4 \pm 0,5$ ИЕ/мл соответственно). Такое же снижение наблюдается и при II стадии ($18,18 \pm 0,34$ ИЕ/мл), однако достоверного различия среди больных с I и II стадиями хронизации не отмечено ($p > 0,05$). Несмотря на это при II степени фиброза имелось достоверное снижение активности α 1-протеиназного ингибитора по сравнению с группой контроля ($18,18 \pm 0,34$ и $26,42 \pm 0,56$ ИЕ/мл, $p < 0,05$).

При исследовании больных с III стадией хронизации выявлено достоверное ($p < 0,05$) снижение активности α 1-протеиназного ингибитора в сыворотке крови в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой, в 2 раза по сравнению с I стадией и в 1,5 раза со II стадией. Что касается диагностики цирроза печени, то и в данном случае отличия достоверные ($p < 0,05$) (таблица 3).

Таблица 3

Активность α 1-протеиназного ингибитора в сыворотке крови у больных хроническими вирусными гепатитами с учетом стадии хронизации

Стадия хронизации	Контроль	1	2	3	4
Активность α 1-протеиназного ингибитора, ИЕ/мл	$26,42 \pm 0,5$	$19,52 \pm 0,33$ *	$18,18 \pm 0,34$ *	$10,61 \pm 0,19$ *	$9,0 \pm 0,2$ *

* - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Таким образом, при изучении данных активности ингибиторов протеаз сыворотки крови выявлена возможность неинвазивной диагностики фиброза печени, наиболее ярко проявляющаяся при исследовании α 1-протеиназного ингибитора: имеет место существенное отличие I стадии от контроля, выраженные изменения при III стадии хронизации и циррозе печени.

В данную работу также было включено исследование оксипролина (свободного, пептидо- и белковосвязанного). Деградация коллагена должна сопровождаться повышением содержания оксипролина. Исследование оксипролина в сыворотке крови представляется доступным показателем в оценке фиброза печени.

Как видно из таблицы 4 свободный оксипролин уже при I стадии хронизации достоверно нарастает практически в 2 раза ($p < 0,05$). Анализ значений свободного оксипролина в сыворотке крови при II степени фиброза указывает на их возрастание, различия носят достоверный характер ($p < 0,05$). Эта тенденция к возрастанию концентрации свободного оксипролина прослеживается и при III стадии хронизации., и при циррозе печени. Однако различия между 3 и 4 стадиями не носят достоверный характер ($p > 0,05$).

Таблица 4

Содержание свободного оксипролина в сыворотке крови у больных хроническими вирусными гепатитами с учетом стадии хронизации

Стадия хронизации	Контроль	1	2	3	4
Свободный оксипролин, ИЕ/мл	0,6±0,03	1,23±0,02 *	1,46±0,015 *	1,52±0,01 *	1,54±0,08 *

* - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Обсуждая уровень пептидо – связанного оксипролина можно говорить о его существенном повышении при нарастании степени фиброза. Так при I стадии хронизации средние показатели концентрации по сравнению с группой контроля повышаются практически в 3 раза, и данное различие носит достоверный характер ($p < 0,05$). Достоверной разницы между I и II стадиями не отмечается, а при III стадии мы видим достоверное повышение его ($p < 0,05$), по сравнению со 2 стадией хронизации (таблица 5).

Таблица 5

Содержание пептидо-связанного оксипролина в сыворотке крови у больных хроническими вирусными гепатитами с учетом стадии хронизации

Стадия хронизации	Контроль	1	2	3	4
Пептидо-связанный оксипролин, ИЕ/мл	0,46±0,02	1,1±0,01 *	0,95±0,08 *	1,22±0,01 *	0,8±0,01 *

* - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Также значительные изменения прослеживаются при определении белково-связанного оксипролина: достоверно повышен его уровень при I стадии хронизации по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Достоверных отличий между I и II степенями фиброза не отмечено ($p > 0,05$), равно как и при III стадии. Тем не менее на всех стадиях имеется достоверная разница с группой контроля ($p < 0,05$), особенно ярко проявляющаяся при циррозе печени, при котором повышение белково-связанного оксипролина более чем в 2 раза ($p < 0,05$). (таблица № 6)

Таблица 6

Содержание белково-связанного оксипролина в сыворотке крови у больных хроническими вирусными гепатитами с учетом стадии хронизации

Стадия хронизации	Контроль	1	2	3	4
Белково-связанный оксипролин, ИЕ/мл	6,72±0,01	11,78±0,07 *	9,74±0,02 *	9,87±0,04 *	12,75±0,11 *

* - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Плазменный фибронектин (ФН) обладает разнообразными биологическими свойствами. Помимо опсонической функции, он выполняет важную роль в воспалительных и регенеративных процессах, механизмах гемостаза, организации межклеточного матрикса. Широкий спектр биологического действия ФН обуславливает его участие в патогенезе различных заболеваний.

В тоже время, в литературе практически отсутствуют сообщения о состоянии ФН при хронических диффузных заболеваниях печени. Результаты определения диагностической и прогностической ценности исследования ФН плазмы крови у больных хроническими вирусными гепатитами приведены в таблице 7.

Таблица 7

Содержание фибронектина в плазме крови у больных хроническими вирусными гепатитами с учетом стадии хронизации

Стадия хронизации	Контроль	1	2	3
Концентрация фибронектина, мг/л	264±10,73	198,25±10,73*	163,89±9,82*	117±7,54*

* - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Согласно полученным нами данным средний уровень фибронектина в плазме крови достоверно отличался в группе здоровых лиц и у больных хроническим гепатитом. Также достоверное различие среднего уровня фибронектина зафиксировано между группами больных с разной стадией фиброза ($p < 0,05$).

Отмечалось достоверное снижение концентрации фибронектина с нарастанием стадии хронизации вирусного гепатита, подтвержденное результатами корреляционного анализа ($R=0,492234$).

Таким образом, подтверждена важная роль фибронектина как диагностического маркера фиброгенеза при хроническом течении вирусных гепатитов.

При анализе взаимосвязей между степенью фиброза и составом воспалительного инфильтрата портальных трактов было подтверждено, что тяжесть хронизации вирусного гепатита достоверно сопряжена с увеличением количества фибробластов в ин фильтрате портальных трактов (таблица 8). Так от I ко II стадии хронизации отмечается достоверное нарастание процентного содержания фибробластов ($12,1 \pm 1,3$ % и $15,3 \pm 1,4$ % соответственно, $p < 0,05$); при III стадии процент содержания фибробластов возрастает почти в 2 раза – $28,7 \pm 1,5$ %.

По мере прогрессирования степени фиброза нарастает оптическая плотность молодых коллагеновых волокон. Так при I степени фиброза их оптическая плотность – $47,3 \pm 5,3\%$, в то время как на II стадии отмечается ее нарастание более чем в 1,5 раза ($71,2 \pm 2,3\%$); на III же стадии нарастание идет более медленно – $89,2 \pm 1,7\%$ (лишь на 18%, $p < 0,05$).

При анализе оптической плотности старых коллагеновых волокон были получены следующие данные: нарастание идет практически в 2 раза от I до II стадии хронизации – от $30,8 \pm 3,1\%$ до $56,3 \pm 2,3\%$ (на 6 %). От II до III стадии нарастание оптической плотности идет менее быстрыми темпами – $70,8 \pm 2,7\%$.

С нарастанием степени фиброза отмечается увеличение удельного веса старого коллагена в портальных трактах – при I и II нарастание достоверное ($34,5 \pm 1,5\%$ и $41,4 \pm 1,9\%$, $p < 0,05$), но более медленное, чем на III степени ($71,3 \pm 1,8\%$, $p < 0,05$) – практически в 2 раза. Наряду с нарастанием удельного веса старого коллагена отмечается закономерное уменьшение молодого коллагена: $65,5 \pm 1,9\%$ при I стадии, $58,5 \pm 1,5\%$ на II стадии хронизации и $28,6 \pm 1,4\%$ на III стадии, различия между стадиями носят достоверный характер ($p < 0,05$). Оптическая плотность отражает насыщенность соединительной ткани и завершенность фиброгенеза. Маленькая оптическая плотность характеризует «рыхлость», отечность соединительной ткани. Чем выше оптическая плотность соединительной ткани, тем более завершенным является фиброгенез.

Таблица 8

Данные морфологического исследования биоптатов печени у больных хроническими вирусными гепатитами с учетом стадии хронизации

Стадия хронизации	1	2	3
Фибробласты, %	$12,1 \pm 1,3$	$15,3 \pm 1,4$	$28,7 \pm 1,5$
Оптическая плотность молодого коллагена, %	$47,3 \pm 5,3$	$71,2 \pm 2,9$	$89,2 \pm 1,7$
Оптическая плотность старого коллагена, %	$30,8 \pm 3,1$	$56,3 \pm 2,3$	$70,8 \pm 2,7$
Молодой коллаген, %	$65,5 \pm 1,9$	$58,5 \pm 1,5$	$28,6 \pm 1,4$
Старый коллаген, %	$34,5 \pm 1,5$	$41,4 \pm 1,9$	$71,3 \pm 1,8$

Сравнительный анализ значимости изученных биохимических показателей в качестве маркеров стадии хронизации гепатита

Морфологическое изучение биоптатов печени у обследованных нами больных проводилось с использованием гистологического индекса фиброза печени (R.G.Knodell et al., 1981 г., J. Sciot, V.J. Desmet, 1994, P.J. Schuener, 1981). Стадия хронического гепатита отражает временное его течение и характеризуется степенью фиброза печени вплоть до развития цирроза (таблица 9).

Таблица 9

Морфологические критерии стадий хронизации вирусных гепатитов

Стадия фиброза	0	1	2	3	4
Характеристика стадий	Нет фиброза	Портальный и перипортальный фиброз	Порто – портальные септы	Порто - центральные септы	Наличие ложных долек (цирроз печени)

Цирроз печени рассматривался как необратимая стадия хронического гепатита.

Сопоставление полученных данных стадий хронизации, диагностированных неинвазивными методами (с помощью сывороточных маркеров) с фиброзными изменениями по данным пункционной биопсии печени позволило разработать определённые критерии в зависимости от степени фиброза Там, где фиброз отсутствовал, содержание коллагеназы было не выше $1,27 \pm 0,04$ мкмоль/(л*ч). Снижение протеиназного ингибитора было не ниже $26,4 \pm 0,5$ ИЕ/мл. При отсутствии фиброзных изменений в печени содержание свободного оксипролина не превышало $0,6 \pm 0,03$ ИЕ, а белково-связанного оксипролина $6,7 \pm 0,01$ ИЕ/мл.

У больных с I степенью фиброза нарастает активность коллагеназы в сыворотке крови до $2,2 \pm 0,2$ мкмоль/(л*ч), снижается активность α 1-протеиназного ингибитора менее $19,2 \pm 0,5$ ИЕ/мл, а также падает активность α 2-макроглобулина ($2,1 \pm 0,23$ ИЕ/мл). Нарастает свободный до $1,2 \pm 0,02$ ИЕ/мл и белково-связанный оксипролин до $11,7$ ИЕ/мл.

При II степени фиброза активность коллагеназы повышается до $3,2 \pm 0,06$ мкмоль/(л*ч), содержание свободного оксипролина увеличивается до $1,46 \pm 0,015$ ИЕ/мл.

При III степени фиброза коллагенолитическая активность крови увеличивается до $3,5 \pm 0,06$ мкмоль/(л*ч), снижается $\alpha 1$ -протеиназный ингибитор до $10,6 \pm 0,1$ ИЕ/мл, повышается свободный оксипролин до $1,52 \pm 0,01$ ИЕ/мл.

Наличие IV стадии хронизации (цирроз печени) характеризуется нарастанием активности коллагеназы до $4,06 \pm 0,072$ мкмоль/(л*ч), снижением $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора до $9,0 \pm 0,26$ ИЕ/мл и ниже, снижение $\alpha 2$ -макроглобулина ниже $1,93 \pm 0,17$ ИЕ/мл, повышение белково-связанного оксипролина до $12,75 \pm 0,11$ ИЕ/мл.

Выводы

1. При гистологическом исследовании биоптатов печени у больных ХВГ в стадию репликации вирусной инфекции при 1 степени фиброза нарастает активность коллагеназы до $2,3$ мкмоль/л*ч, снижается активность $\alpha 2$ – макроглобулин до $2,1$ ИЕ/мл и $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора до $19,2$ ИЕ/мл

2. У больных ХВГ при нарастании степени фиброза до 2-й степени активность коллагеназы повышается до $3,2$ мкмоль/л*ч, остается низкой по сравнению с нормой активность $\alpha 2$ -макроглобулина – $2,8$ ИЕ/мл и $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора – $18,1$ ИЕ/мл.

3. При 3-й степени фиброза активность коллагеназы достоверно повышается до $3,5$ мкмоль/л*ч, остается низкой активность $\alpha 2$ -макроглобулина – $2,9$ ИЕ/мл и $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора в сравнении с 1 и 2 степенями фиброза – $10,6$ ИЕ/мл

4. При 4-й степени фиброза – циррозе печени, активность коллагеназы возрастает более чем в 3 раза по сравнению с нормой ($1,2$ мкмоль/л*ч), в 2 раза – по сравнению с 1-й степенью фиброза и достоверно выше, чем при 2-й и 3-й степенях фиброза – $4,6$ мкмоль/л*ч. Активность ингибиторов протеиназ ($\alpha 2$ -макроглобулина и $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора) достигает низких цифр – $1,9$ и $9,0$ ИЕ/мл соответственно

5. При изучении продуктов деградации коллагена в сыворотке крови (свободного и белково-связанного оксипролина) отмечается повышение этих показателей уже при 1 степени фиброза. При нарастании степени фиброза

достоверно возрастает концентрация свободного оксипролина, а концентрация белково-связанного остается повышенной при 2 и 3 степенях фиброза печени и более чем в 2раза нарастает при 4 степени фиброза (циррозе печени).

6. Содержание фибронектина в сыворотке крови обратно коррелирует с гистологически выявленной стадией хронизации гепатита: при нарастании степени фиброза уровень фибронектина достоверно снижается.

7. Уменьшение суммарного объема «молодой» и увеличение доли «старой» соединительной ткани сопровождается утяжелением стадии хронизации хронического гепатита независимо от давности заболевания.

Практические рекомендации

1. Определение сывороточных маркеров фиброза (коллагенолитическая активность, продукты деградации коллагена – оксипролин и его фракции, активность ингибиторов протеаз, концентрация фибронектина) позволяет проводить неинвазивную диагностику стадий хронизации вирусных гепатитов и цирроза печени,

2. Использование сывороточных маркеров фиброза печени дает возможность применять их в лечебном процессе для контроля за противовирусной терапией, динамического наблюдения за прогрессированием фиброзных изменений печени, не прибегая к повторным биопсиям печени.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Метаболические аспекты течения хронического вирусного гепатита /Соавторы Белобородова Э.И., Савченко И.В., Белобородова Е.В. и др. //Российский журнал гастроэнтерологии и колопроктологии. Т. 14 - №1 – 2004 – Приложение № 22 «Гепатология сегодня» материалы 9ой российской конференции 22 – 24 марта – Москва, 2004. – С. 5.

2. Возможности прогнозирования неблагоприятных исходов интерферонотерапии при хронических вирусных гепатитах / Соавторы Белобородова Э.И., Черногорюк Г.Э., Савченко И.В и др //Российский журнал гастроэнтерологии и колопроктологии. Т. 14 - №1 – 2004 – Приложение №22 «Гепатология сегодня» материалы 9ой российской конференции 22 – 24 марта – Москва, 2004. – С. 8.

3. Состояние системы гемостаза у больных хроническим вирусным гепатитом с поражением миокарда / Соавторы Белобородова Э.И., Черног-

рюк Г.Э., Кищук И.П. //Российский журнал гастроэнтерологии и колопроктологии. Т. 14 - №1 – 2004 – Приложение №22 «Гепатология сегодня» материалы 9-й российской конференции 22 – 24 марта – Москва, 2004. – С. 15.

4. Прогнозирование исходов хронических вирусных гепатитов /Соавторы Белобородова Э.И., Савченко И.В., Белобородова Е.В. // Международная научная конференция «Медико – биологические и экологические проблемы здоровья человека на Севере» 1 ноября 2004.-Сургут, 2004. – С. 92-95.

5. Метаболические аспекты прогнозирования исходов хронических вирусных гепатитов /Соавторы Белобородова Э.И., Савченко И.В., Белобородова Е.В. и др. // Клиническая медицина.- 2005. - №2. - С. 53-56

6. Нарушение иммунитета, метаболизма липидов, перекисное окисление липидов, антиоксидантной защиты в оценке тяжести течения хронических гепатитов /Соавторы Белобородова Э.И., Савченко И.В., Белобородова Е.В. и др. //4-я Восточно – Сибирская гастроэнтерологическая конференция «Клинико – эпидемиологические и этнографические аспекты заболеваний органов пищеварения» 7-9 апреля Хакасия. –Абакан, 2004. - С. 115-118

7. Гистологический критерии хронического вирусного гепатита /Соавторы Белобородова Э.И., Савченко И.В., Белобородова Е.В. и др.// 6-й международный Славяно – Балтийский форум «Гастроэнтерология – 2004». Санкт - Петербург - № 2- 3. – С. 4

8. Особенности течения хронического вирусного гепатита при сочетании с хроническим описторхозом. /Соавторы Белобородова Э.И., Рачковский М.И. Белобородова Е.В. и др. // Клиническая медицина. – 2004. - № 8. – С. 48-51

9. Содержание альфа – фетопротеина в сыворотке крови у больных хроническим вирусным гепатитом /Соавторы Белобородова Э.И., Савченко И.В., Белобородова Е.В. и др. //III конференция гастроэнтерологов Южно-федерального округа. – Ростов-на-Дону, 2004. – С. 87-88.

10. Содержание фибронектина в плазме крови у больных хроническим вирусным гепатитом /Соавторы Белобородова Э.И., Белобородова Е.В., Пурлик И.Л. и др. // Одиннадцатая российская конференция «Гепатология сегодня» 27 – 29 марта 2006. – Москва. – С. 47.

11. Коллагенолитическая активность крови у больных хроническим вирусным гепатитом /Соавторы Белобородова Э.И., Белобородова Е.В., и др. // 8-й международный Славяно – Балтийский форум «Гастроэнтерология – 2006». 17 – 19 мая . - Санкт - Петербург. – С. 24.

12. Патент на изобретение № 2244306 от 10.01.2005 Способ прогнозирования возможного цирроза печени при хронических вирусных гепатитах / Соавторы Савченко И.В., Белобородова Э.И., Белобородова Е.В // Официальный бюллетень Российского агентства по патентам и товарным знакам. - 2005. - № 1.

13. Патент на изобретение №2270451 от 20.02.2006 Способ диагностики фиброзного процесса в печени при хронических вирусных гепатитах /Соавторы Белобородова Э.И., Белобородова Е.В., Савченко И.В., Рачковский М.И. // Официальный бюллетень Российского агентства по патентам и товарным знакам. – 2006. - № 5.

Список сокращений

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АЛТ – аланинаминотрансфераза

ВКМ – внеклеточный матрикс

ИГА – индекс гистологической активности

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

УЗИ – ультразвуковое исследование

ХВГ – хронический вирусный гепатит

ЩФ – щелочная фосфатаза

HAV – вирус гепатита А

HBV – вирус гепатита В

HCV – вирус гепатита С

HDV – вирус гепатита D

IgA – иммуноглобулин А

IgG – иммуноглобулин G

IgM – иммуноглобулин M

Заказ 479. Тираж 100.
Томский государственный университет
систем управления и радиоэлектроники
634034, г. Томск, пр. Ленина, 40