

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ

Останин А.А., Гельфгат Е.Л., Шипунов М.В.,
Шевела Е.Я., Курганова Е.В., Хван Л.А., Пальцев А.И.,
Старостина Н.М., Черных Е.Р.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

Резюме. Настоящая работа посвящена разработке прогностической модели, которая включает доступные лабораторные тесты, отражающие гистологическую стадию фиброза печени у больных хроническими вирусными гепатитами (ХВГ). В «обучающий» массив были включены здоровые волонтеры без признаков фиброза (F0, n = 37) и 126 больных ХВГ с начальным (F1/2, n = 40) и распространенным (F3, n = 39) фиброзом, а также с морфологически документированным циррозом печени (F4, n = 47). Показано, что отдельные клинико-биохимические (СОЭ, тромбоциты, ПТИ, альбумин, билирубин, АСТ, тимоловая проба) и иммунологические (IgA, IgG) тесты, а также специфические маркеры фиброгенеза (MMP-9, TIMP-1) характеризуются значимой корреляционной взаимосвязью с выраженностью фиброза ($r_s = 0,45-0,69$; $p < 0,0001$). При создании прогностической модели использовали множественный, линейный, пошаговый регрессионный анализ лабораторных параметров в группах F1/2 и F3, F3 и F4, соответственно. В результате было получено уравнение множественной регрессии, которое позволяло на основе 5 биохимических показателей (ПТИ, глюкоза, альбумин, АСТ, ЛДГ) рассчитать интегральный индекс фиброза (ИИФ). Диагностическая точность разработанной модели была проверена на «экзаменационном» массиве 84 больных ХВГ (F1/2 n = 42; F3 n = 19; F4 n = 23). Значения ИИФ в установленных интервалах позволяют прогнозировать соответствующую стадию фиброза (F1/2 vs F3 vs F4) с диагностической точностью 86% (у 72 из 84 больных). Из 12 случаев ошибочной диагностики у 8,3% (7/84) больных были получены ложноотрицательные результаты и в 6,0% случаев (5/84 больных) — ложноположительные результаты. Таким образом, интегральный индекс фиброза, который рассчитывается на основе 5 доступных лабораторных тестов, позволяет получить клинически важную информацию о развитии фиброза у больных ХВГ.

Ключевые слова: хронические вирусные гепатиты, стадии фиброза, маркеры фиброза, MMP-9, TIMP-1.

Ostanin A.A., Gelfgadt E.L., Shipunov M.V., Shevela E.Ya., Kurganova E.V., Khvan L.A., Paltzev A.I., Starostina N.M., Chernykh E.R.

A PREDICTIVE MODEL FOR NON-INVASIVE EVALUATION OF LIVER FIBROSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS VIRUS INFECTION

Адрес для переписки:

Останин Александр Анатольевич
630099, г. Новосибирск,
ул. Ядринцевская, 14,
НИИ клинической иммунологии СО РАМН.
Тел.: (383) 236-03-29.
Факс: (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Abstract. This study was conducted to develop a predictive model including routinely available laboratory tests to reflect the histological liver fibrosis stage in patients with chronic hepatitis virus infection (HVI). The «training» (preliminary) cohort included 37 healthy volunteers without liver fibrosis (F0) and 126 patients with minimal (F1/2, n = 40) and significant/advanced (F3, n = 39) fibrosis and histological cirrhosis (F4, n = 47). It was revealed that several routine clinical/

biochemical parameters (erythrocyte sedimentation rate, platelet count, prothrombin time [PT], serum level of albumin [Alb], bilirubin, aspartate aminotransferase [AST], thymol test) and immunological features (IgA, IgG) as well special fibrosis markers (MMP-9, TIMP-1) significantly correlated with severity of liver fibrosis (Spearman's rank correlation coefficient 0.45-0.69; $p < 0.0001$). To select predictive factors contributing to discrimination of the fibrosis stage, we performed a stepwise logistic multivariate regression of the laboratory variables in F1/2 vs F3, and F3 vs F4 patients, respectively. Based on the multiple regression model, we derived a novel Integral Index of Fibrosis (IIF) defined by five biochemical parameters (PT, glucose, Alb, AST, lactate dehydrogenase). IIF was applied to the validation cohort comprised of 84 patients with chronic HVI (F1/2 $n = 42$; F3 $n = 19$; F4 $n = 23$) to test its diagnostic accuracy. Corresponding values of IIF allow a reliable prediction of fibrosis stages (F1/2 vs F3 vs F4) with a diagnostic accuracy of 86%; with a positive predictive value (PPV is the percentage of positive tests that are truly positive) of 94%; and with a negative predictive value (NPV is the percentage of negative tests that are truly negative) of 91.7%. In conclusion, our study showed that the Integral Index of Fibrosis consisting of five routinely available laboratory tests provides clinically useful information regarding different liver fibrosis stages among patients with chronic hepatitis virus infection. (*Med. Immunol., vol. 10, N 4-5, pp 405-414*)

Процесс фиброгенеза при хронических вирусных гепатитах является ответной реакцией организма на повреждение печени, которая инициируется и поддерживается хроническим воспалительным процессом [2]. Развитие фиброза связано с избыточным отложением соединительной ткани в результате усиления продукции и нарушения деградации белков внеклеточного матрикса. Наибольшую роль в развитии фиброза отводят локальным механизмам, в частности, звездчатым клеткам, способным при активации трансформироваться в пролиферирующие миофибробласты и продуцировать коллаген, а также тканевые ингибиторы металлопротеиназ — ферменты деградации коллагена.

Ранее традиционным было представление о необратимости фиброза, однако в настоящее время доказана возможность его регресса, особенно на начальных стадиях фиброзирования печени. В то же время фиброз на стадии морфологического цирроза, характеризующийся глубоким изменением архитектоники паренхимы печени, считается необратимым. В связи с огромной ролью фиброза в патогенезе хронических вирусных гепатитов большое значение при ведении пациентов имеет мониторингирование фиброзных изменений, что позволяет своевременно начать адекватную комплексную терапию и предупредить трансформацию фиброза печени в цирроз.

В настоящее время пункционная биопсия печени (ПБП) с последующим морфологическим исследованием биоптата считается «золотым стандартом» определения степени тяжести фиброза [17]. К сожалению, данный метод имеет ряд существенных ограничений и недостатков [5]. Пункционная биопсия, выполняемая чрезкожным или лапароскопическим путем, является инвазивной методикой с определенным процентом осложнений (абдоминальные и торакальные кровотечения, пневмоторакс, ранения желчного пузыря и протоков, перитонит) вплоть до летальных исходов. Вследствие

этого ПБП фактически приравнивается к малому оперативному вмешательству на органах брюшной полости. При ПБП существует вероятность так называемой «ошибки попадания», когда биопсийная игла попадает в участок ткани с менее или, наоборот, более выраженными изменениями, чем в целом в печени. Кроме того, информативен только пунктат длиной не менее 10-20 мм, содержащий не менее 7-9 порталных трактов, что не всегда удается достичь при проведении ПБП. У ряда пациентов биопсию печени невозможно выполнить, так как имеются противопоказания (кисты, гемангиомы печени, тромбоцитопения, различные нарушения гемостаза, гемофилия и др.). Существенной проблемой является также необходимость выполнения повторных биопсий для динамической оценки выраженности фиброза в процессе лечения.

Все выше изложенное обосновывает необходимость разработки неинвазивных методик диагностики фиброза печени, базирующихся на использовании рутинных, клинических тестов.

Материалы и методы

В работе был проведен ретроспективный анализ историй болезни 160 больных с хроническими диффузными заболеваниями печени, которым за период 2006-2007 гг. было выполнено комплексное лабораторное обследование, включающее биопсию печени. Из дальнейшего анализа были исключены 34 больных на основании следующих критериев: а) наличие аутоиммунного ($n = 4$), криптогенного ($n = 7$), билиарного ($n = 2$) или токсического ($n = 10$) гепатита/цирроза; б) выявление на момент обследования высокого (более 5 норм) уровня альфафетопротеина в сыворотке крови ($n = 6$), как маркера возможного развития гепатокарциномы; в) невозможность морфологической оценки полученного образца биоптата печени ($n = 5$). Таким образом, в иссле-

дование были включены 126 больных хроническими вирусными гепатитами (ХВГ): 90 мужчин и 36 женщин, в возрасте от 13 до 72 лет (средний возраст 39 лет). Преобладающее большинство больных были инфицированы вирусом гепатита С в изолированном виде (77/126, 61%) или в сочетании с вирусом гепатита В или В+D (19/126, 15%). Моноинфекция вирусом гепатита В была выявлена в оставшихся 24% случаев (30/126). Диагноз ХВГ устанавливали на основании клинико-эпидемиологических и биохимических данных и подтверждали определением маркеров инфицирования методом иммуноферментного анализа (HbsAg, AT HBsAg, AT HBcore Ag, AT HBcore IgM, HbeAg, AT HbeAg IgG, AT HDV, AT HCV, AT HScore IgM) и/или полимеразной цепной реакции (ДНК HBV и РНК HCV в сыворотке крови, моноклеарных клетках, биоптате печени).

Практически половина больных ХВГ (62/126, 49%), включенных в исследование, характеризовалась наличием клинических проявлений цирроза печени. В соответствии с классификацией по Child-Pugh класс А диагностирован у 16 (26%), класс В — у 31 (50%) и класс С — у 15 пациентов (24%).

Образцы печеночной ткани для морфологического исследования получали в результате чрезкожной пункционной аппаратной биопсии печени под УЗИ-навигацией. Выраженность фиброза оценивали по шкале METAVIR [3], выделяя следующие стадии: F0 — нет фиброза; F1 — звездчатое расширение портальных трактов без формирования септ; F2 — увеличение портальных трактов с формированием редких септ; F3 — множественные септы без цирроза; F4 — цирроз.

Все лабораторные исследования проводили при поступлении больного в стационар, т.е. до выполнения пункционной биопсии печени и начала комплексной терапии. Биохимические исследования включали определение 30 показателей, в том числе уровень глюкозы натощак (ммоль/л), протромбиновый индекс (ПТИ, %), альбумин (г/л), тимоловая проба (Ед), общий и прямой билирубин (мкмоль/л), аланинаминотрансфераза (АЛТ, ммоль/ч х л), аспартатаминотрансфераза (АСТ, ммоль/ч х л), лактатдегидрогеназа (ЛДГ, Ед/л), щелочная фосфатаза (ЩФ, Ед/л), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП, Ед/л), холестерин (ммоль/л) и др.

Общий анализ периферической крови проводили на гемоанализаторе «HEMA-Screen 13» (Швейцария—Италия).

Относительное количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR антигены, а также субпопуляционный состав лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, «Becton Dickinson», США) с помощью

моноклональных антител против CD3, CD4, CD8, CD19 («МедБиоСпектр» и «Сорбент», Россия). Функциональную активность фагоцитарных клеток оценивали по показателю активации нейтрофилов (ПАН) и моноцитов (ПАМ), определяемому по продукции перекиси водорода клетками после стимуляции зимозаном. Результат оценивался на многоканальном спектрофотометре (Multiskan MS, «Labsystems», Финляндия) по интенсивности окрашивания пробы, которое происходило за счет окисления ортофенилдиами-на в процессе катаболизма перекиси водорода.

Концентрацию иммуноглобулинов класса G, M, A в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини с использованием соответствующих диагностических наборов (производства НПЦ «Медицинская иммунология», Москва). Лабораторный скрининг включал также определение сывороточного уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК, усл. ед.)

В сыворотке крови 94 больных ХВГ и 18 здоровых доноров крови определяли концентрацию матричной металлопротеиназы-9 (MMP-9, нг/мл) и тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 (TIMP-1, нг/мл) с использованием коммерческих иммуноферментных тест-систем human MMP-9 (total) (Quntikine®, «R&D Systems») и human TIMP-1 («Biosource»), соответственно. Пороговая чувствительность данных наборов составляла менее 1 нг/мл.

Все исследования проводили после получения письменного информированного согласия больных и были одобрены решением Локального этического комитета ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Группу контроля составили 68 условно здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и возрасту (47 мужчин и 21 женщина, средний возраст 44 года).

Для математической обработки полученных данных использовали программу STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Сравнение средних значений в выборках осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты и обсуждение

По результатам гистологического исследования биоптатов печени F1 стадия была выявлена у 7 (5,5%), F2 стадия — у 33 (26,2%), F3 и F4 стадии — у 39 (40%) и 47 (37,3%) больных ХВГ, соответственно. В результате были выделены три подгруппы больных с начальным (F1/2, n = 40) и распространенным (F3, n = 39) фиброзом, а также с морфологически документированным циррозом печени (F4, n = 47). Общая характеристика

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ХВГ С РАЗЛИЧНОЙ ВЫРАЖЕННОСТЬЮ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

	Подгруппы больных ХВГ/стадия фиброза		
	F1/2 (n = 40)	F3 (n = 39)	F4 (n = 47)
Пол (м/ж)	30/10	27/12	33/14
Возраст (лет)	28 (19-57)	38 (22-72)	49 (13-68)
ИМТ	23,3 (16,8-32,5)	24,3 (17,3-36,0)	25,5 (16,5-44,7)
ХВГ/ХВГ + ЦП	40/0	20/19	4/43
Маркеры гепатита			
С	28/40 (70,0%)	22/39 (56,4%)	27/47 (57,5%)
В	5/40 (12,5%)	13/39 (33,3%)	12/47 (25,5%)
Смешанные формы	7/40 (17,5%)	4/39 (10,3%)	8/47 (17,0%)
Класс ЦП по Child-Pugh			
А	–	7/19 (36,8%)	9/43 (20,9%)
В	–	12/19 (63,2%)	19/43 (44,2%)
С	–	–	15/43 (34,9%)

Примечание: данные представлены в виде Median (min-max) и частоты встречаемости признака. ИМТ – индекс массы тела, рассчитанный по формуле: вес(кг)/рост(м)².

больных в сформированных группах представлена в таблице 1. Видно, что утяжеление фиброза ассоциируется с увеличением возраста и индекса массы тела больных. Так, корреляционный анализ показал наличие прямой взаимосвязи степени тяжести фиброза с данными показателями (соответственно, $r_s = 0,44$ и $0,32$; $p < 0,001$).

В группе пациентов с фиброзом в начальной F1/2 стадии не было выявлено ни одного случая ХВГ в сочетании с циррозом печени. Тогда как 19 из 39 пациентов с F3 и 43 из 47 больных с F4 стадией фиброза характеризовались наличием клинической симптоматики ЦП в компенсированной (класс А в 36,8 и 20,9% случаев) или в декомпенсированной форме (класс В у 63,2 и 44,2% больных, соответственно). Наиболее тяжелый клинический вариант ЦП (класс С по Child-Pugh) регистрировался только у пациентов с F4 стадией фиброза печени. Тем не менее, 4 больных с морфологически документированной F4 стадией не имели клинических проявлений ЦП.

Таким образом, по отсутствию или наличию клинических симптомов ЦП можно с определенной долей вероятности судить только о двух стадиях развития фиброза (соответственно, либо начальной F1/F2, либо терминальной F4 стадии). В то же время достаточно большая группа больных (39/126; 40%) с фиброзом в F3 стадии

ТАБЛИЦА 2. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПАРАМЕТРЫ В ПОДГРУППАХ БОЛЬНЫХ ХВГ С РАЗЛИЧНОЙ ВЫРАЖЕННОСТЬЮ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Параметры	Доноры (n = 38)	Больные (F1/2, n = 40)	Больные (F3, n = 39)	Больные (F4, n = 47)	r_s	p
Гемоглобин, г/л	140 (128-150)	149,5 (137-162)	138 (125-149)	126 (113-139)	-0,48	0,000001
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,54 (4,2-4,9)	4,77 (4,36-5,32)	4,45 (3,96-4,78)	3,83 (3,42-4,39)	-0,47	0,000001
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	5,25 (4,5-6,4)	6,15 (5,3-7,1)	5,3 (3,5-6,8)	4,5 (3,2-6,7)	-0,27	0,002
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	220 (185-263)	275 (235-332)	153 (121-222)	127 (77-175)	-0,61	0,000001
Лимфоциты, $\times 10^9/л$	1,74 (1,47-2,16)	2,14 (1,75-2,38)	1,76 (1,11-2,31)	1,39 (0,92-1,97)	-0,36	0,00003
СОЭ, мм/ч	до 10	8 (5-10)	13 (7-25)	24 (13-35)	0,50	0,000001
Глюкоза, ммоль/л	4,4 (4,0-4,6)	4,1 (3,8-4,4)	4,3 (3,9-4,7)	4,5 (4-5,4)	0,28	0,001
ПТИ, %	95 (92-102)	97 (92-99)	91 (83-97)	79 (70-86)	-0,65	0,000001
Альбумин, г/л	45,5 (43,4-46,8)	44,7 (42,4-47,0)	40,3 (37,1-43,8)	32,8 (29,5-38,6)	-0,69	0,000001
Тимол. проба, Ед	2,05 (0,94-3,13)	3,6 (1,8-5,3)	5,2 (2,4-7,4)	8,7 (5,5-13,4)	0,52	0,000001
Общ. бил, мкмоль/л	9,0 (6,5-11,7)	14,6 (10,5-19,7)	15,5 (11,5-23,4)	38,0 (14,8-62,5)	0,39	0,000005
Прям. бил, мкмоль/л	2,6 (1,2-3,2)	2,7 (1,8-3,8)	3,6 (2,1-7,3)	16,7 (6,4-36,8)	0,63	0,000001
АЛТ, ммоль/ч х л	0,34 (0,24-0,45)	1,2 (0,63-2,58)	1,55 (0,98-2,24)	1,72 (1,1-2,78)	0,16	0,08
АСТ, ммоль/ч х л	0,32 (0,25-0,40)	0,57 (0,37-0,97)	0,86 (0,63-1,0)	1,37 (0,92-1,84)	0,47	0,000001
ЛДГ, Ед/л	300 (268-357)	332 (292-394)	347 (317-421)	419 (339-526)	0,32	0,0002
ЩФ, Ед/л	60,8 (48,0-76,4)	69 (59-81)	76 (59-115)	107 (78-165)	0,40	0,000004
ГГТП, Ед/л	16,7 (12,4-21,9)	24,3 (14,3-48,9)	45,6 (20,8-80,7)	43,6 (33,5-112)	0,28	0,001
Холестерин, ммоль/л	4,5 (4,1-4,8)	4,6 (3,7-5,7)	4,1 (3,1-4,8)	3,7 (2,8-4,6)	-0,27	0,002

Примечание: данные представлены в виде Median (LQ-UQ). r_s – коэффициент корреляции Спирмена исследуемых параметров со стадией фиброза; p – достоверность корреляционных взаимосвязей.

является своеобразной «зоной перекрытия», где примерно с равной частотой могут встречаться варианты ХВГ как с наличием, так и с отсутствием симптомов портальной гипертензии – клиническим маркером ЦП.

Сравнительная оценка «рутинных» параметров общего и биохимического анализа крови в сформированных подгруппах больных показала, что прогрессия фиброза четко ассоциируется с изменением (снижением и/или увеличением) целого комплекса показателей (табл. 2). Многие из этих маркеров характеризуют развитие известных лабораторных синдромов фиброзного поражения печени [2]. Так, анемия и панцитопения (тромбо-, лейко- и лимфопения) являются маркерами синдрома гиперспленизма. Нарастающая печеночно-клеточная недостаточность проявляется снижением уровня альбумина ($r_s = -0,69$) и холестерина ($r_s = -0,27$) в сочетании с увеличением общего ($r_s = 0,39$) и прямого ($r_s = 0,63$) билирубина. Прогрессирующее снижение альбумина, холестерина и ПТИ ($r_s = -0,65$), а также увеличение АСТ ($r_s = 0,47$), АЛТ, ГГТП ($r_s = 0,28$) и ЛДГ ($r_s = 0,32$) свидетельствуют о развитии цитолитического синдрома.

Наличие хронической вирусной инфекции, а также развитие лимфопении на продвинутых стадиях фиброза позволяет предположить вовлеченность иммунологических нарушений в процесс фиброгенеза. Действительно, сравнительный анализ параметров иммунного статуса больных в сформированных подгруппах показал (табл. 3), что прогрессия фиброза сопряжена со снижением абсолютного количества CD3 и CD4 Т-клеток, а также абсолютного и относительного количества цитотоксических CD8⁺Т-

лимфоцитов. Кроме того, выявляются нарушения в фагоцитарном звене иммунитета в виде снижения функциональной активности моноцитов (ПАМ, $r_s = -0,29$) и нейтрофилов (ПАН, $r_s = -0,47$). В то же время нарастание степени тяжести фиброза у больных с ХВГ ассоциируется с прогredientным увеличением сывороточного уровня IgM ($r_s = 0,25$), IgA ($r_s = 0,54$), IgG ($r_s = 0,51$) и аутоантител (данные не представлены), что в сочетании с выраженным увеличением тимоловой пробы ($r_s = 0,52$; см. табл. 2) может свидетельствовать о Th1 → Th2 переключении, в том числе, с возможным развитием аутоиммунных реакций на фоне прогрессирующей печеночной деструкции в процессе фиброгенеза.

Прогрессия фиброза проявляется также изменением сывороточного уровня и баланса продукции матричной металлопротеиназы-9 (ММР-9) и тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 (ТИМР-1). Из данных рисунка 1 видно, что по сравнению со здоровыми донорами в сыровотке крови больных на начальных F1/2 стадиях фиброза регистрируется достоверное увеличение концентрации и ММР-9, и ТИМР-1. Тем не менее, индекс соотношения ТИМР-1/ММР-9, отражающий баланс продукции данных медиаторов, сохраняется на уровне нормативных значений ($1,35 \pm 0,18$ и $1,41 \pm 0,34$ расч. ед. у доноров и больных, соответственно). Прогрессия фиброза и переход из F1/2 в F3/F4 стадию сопровождается практически 2-кратным снижением уровня ММР-9 в сочетании с достоверным увеличением концентрации ТИМР-1. В результате средние значения индекса соотношения ТИМР-1/ММР-9 возрастают с $1,41 \pm 0,34$ до $2,58 \pm 0,24$ и $4,02 \pm 0,48$ расч. ед. у больных с F3 и F4 стадией, соответ-

ТАБЛИЦА 3. ИММУННЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ ХВГ С РАЗЛИЧНОЙ ВЫРАЖЕННОСТЬЮ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Показатели	Доноры (n = 68)	Больные (F1/2, n = 40)	Больные (F3, n = 39)	Больные (F4, n = 47)	r_s	p
CD3 Т-клетки, %	65 (57-71)	63 (55-68)	65 (56-70)	58 (50-65)	-0,14	0,12
CD3 Т-клетки, кл/мм ³	1129 (894-1390)	1113 (834-1459)	970 (548-1262)	798 (564-1058)	-0,27	0,002
CD4 Т-клетки, %	37 (31-42)	36 (27-40)	37 (30-43)	33 (25-39)	-0,04	0,62
CD4 Т-клетки, кл/мм ³	629 (466-852)	601 (435-832)	545 (309-710)	410 (292-642)	-0,23	0,01
CD8 Т-клетки, %	23 (18-28)	28 (23-32)	26 (21-28)	23 (20-27)	-0,29	0,001
CD8 Т-клетки, кл/мм ³	424 (259-586)	475 (409-664)	387 (241-578)	313 (210-457)	-0,33	0,0002
CD4/CD8 индекс	1,63 (1,17-2,07)	1,28 (0,96-1,5)	1,39 (1,15-1,66)	1,47 (0,93-1,82)	0,14	0,11
CD19 В-клетки, %	1,74 (1,47-2,16)	15 (11-18)	18 (13-22)	16 (12-21)	0,08	0,38
HLA-DR моноциты, %	89 (80-94)	93 (90-94)	92 (90-94)	93 (91-94)	0,05	0,60
ПАМ, усл. ед.	2,4 (1,7-2,88)	1,9 (1,5-2,0)	1,7 (1,4-2,0)	1,56 (1,3-1,8)	-0,29	0,001
ПАН, усл. ед.	2,38 (2,0-2,8)	4,8 (3,7-6,2)	4,16 (2,4-5,6)	2,4 (1,7-3,6)	-0,47	0,000001
IgM, г/л	1,63 (1,3-2,2)	1,7 (1,4-2,25)	2,3 (1,2-3,6)	2,4 (1,5-4,4)	0,25	0,007
IgA, г/л	1,25 (1,05-1,6)	1,88 (1,4-2,2)	2,25 (1,6-3,7)	3,65 (2,4-4,9)	0,54	0,000001
IgG, г/л	9,5 (8,6-11,0)	12,6 (9,7-15,9)	14,3 (11,0-20,9)	21,0 (15,6-27,4)	0,51	0,000001
ЦИК, усл. ед.	16 (13-21)	22 (13,5-29)	22 (14-30)	24 (18-36)	0,16	0,08

Примечание: данные представлены в виде Median (LQ-UQ). r_s – коэффициент корреляции Спирмена исследуемых показателей со стадией фиброза; p – достоверность корреляционных взаимосвязей.

ственно ($p_U < 0,01$). В целом по группе обследованных больных ХВГ ($n = 94$) между степенью тяжести фиброза и уровнем MMP-9 была выявлена обратная корреляционная связь ($r_s = -0,44$; $p < 0,01$). В свою очередь увеличение концентрации TIMP-1 и индекса TIMP-1/MMP-9 было прямо взаимосвязано с прогрессией фиброза (соответственно, $r_s = 0,44$ и $r_s = 0,54$; $p < 0,01$).

Интересно также отметить, что у больных ХВГ сывороточный уровень и баланс продукции MMP-9 и TIMP-1 тесно коррелировали с изменением показателей реологии и свертывания крови (СОЭ, количество тромбоцитов, уровень фибриногена, альбумина, ПТИ). Так, например, между увеличением СОЭ и концентрацией MMP-9 выявлялась обратная взаимосвязь ($r_s = -0,35$; $p < 0,01$), тогда как с уровнем TIMP-1 и индексом

соотношения TIMP-1/MMP-9 – прямая зависимость ($r_s = 0,30$ и $r_s = 0,40$; $p < 0,01$).

Таким образом, сравнительная оценка параметров общего и биохимического анализа крови, а также показателей иммунного статуса четко свидетельствует о сопряженности степени тяжести фиброза печени с изменением целого комплекса лабораторных тестов. Некоторые из них характеризуются сильной корреляционной взаимосвязью с выраженностью фиброза ($r_s > 0,45$). К таковым можно отнести и относительно простые, «рутинные» клинико-биохимические (СОЭ, тромбоциты, ПТИ, альбумин, тимоловая проба, прямой билирубин, АСТ), и иммунологические (IgA, IgG) тесты, но также и редко используемые в клинической практике специфические маркеры фиброгенеза (MMP-9, TIMP-1). Найденные нами взаимосвязи в целом хорошо согласуются с данными литературы и указывают на потенциальную возможность использования различных лабораторных показателей для неинвазивной диагностики стадии фиброза печени.

Наиболее перспективным направлением в этой области является создание комбинированных шкал или индексов (с оценкой в баллах). В настоящее время разработано несколько таких индексов (табл. 4), которые могут выступать в качестве предикторов наличия и/или степени тяжести фиброза печени.

Тем не менее, предложенные подходы имеют несколько общих существенных недостатков. Во-первых, для некоторых из них (№ 1, 3, 4, 7) не определена диагностическая точность, что не позволяет оценить адекватность их использования для определения степени тяжести фиброза. Во-вторых, установленные диагностические пороги для отдельных индексов (№ 2, 5, 8, 9, 10) позволяют удовлетворительно распознавать только два состояния: отсутствие/начальные стадии фиброза (F0/F1) и клинически значимый фиброз, в том числе с исходом в цирроз печени (F3/F4). При этом предложенные подходы, как правило, не могут четко дифференцировать стадии фиброза по отдельности (F1; F2; F3; F4), а также не позволяют оценить возможные переходные состояния от одной стадии к другой в процессе фиброгенеза. Вследствие этого достаточно большое количество пациентов (от 30 до 50%) остается за рамками диагностики, так как у них индивидуальные показатели тех или иных индексов не выходят за границу установленных пороговых значений. В-третьих, некоторые предложенные шкалы и индексы (№ 10, 11, 12) включают не только «рутинные» клинико-биохимические тесты, но также и специфические маркеры фиброгенеза (гиалуроновая кислота, тканевые ингибиторы металлопротеиназ, IL-10, TGFβ1 и т.д.),

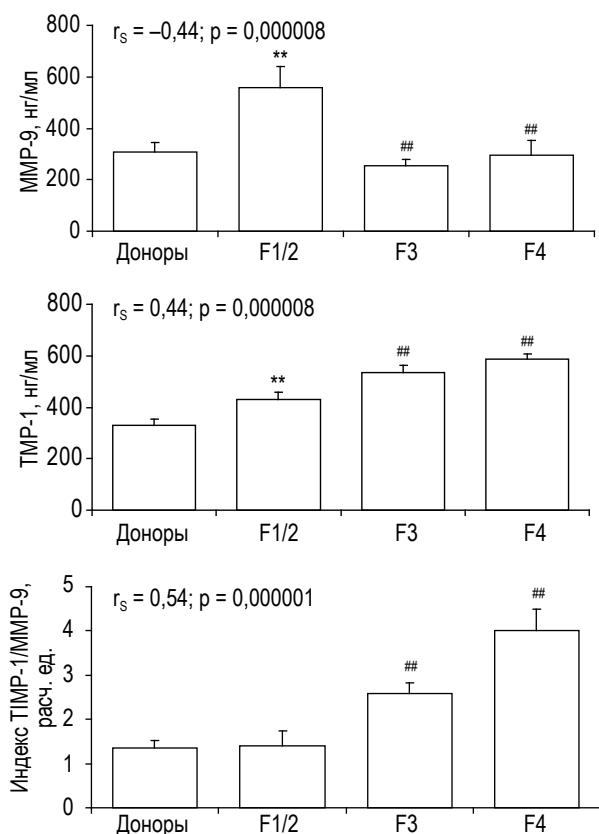


Рисунок 1. Уровень и соотношение TIMP-1 и MMP-9 в сыворотке крови здоровых доноров и больных ХВГ с различной выраженностью фиброза печени

Примечания. Представлены средние значения ($M \pm S.E.$) содержания и индекса соотношения TIMP-1/MMP-9 в сыворотке крови здоровых доноров ($n = 18$) и больных ХВГ с начальным (F1/2, $n = 33$) и распространенным (F3, $n = 27$) фиброзом, а также с морфологически документированным циррозом печени (F4, $n = 34$). ** – $p_U < 0,01$, достоверность различий по сравнению с донорами; ## – $p_U < 0,01$, достоверность различий по сравнению с F1/2 (U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни); r_s – коэффициент корреляции Спирмена исследуемых параметров со стадией фиброза; p – достоверность корреляционных взаимосвязей.

ТАБЛИЦА 4. ПОКАЗАТЕЛИ, ИНДЕКСЫ И ШКАЛЫ ОЦЕНКИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

№	Показатель/индекс	Определение	Ссылка
1	Тромбоциты крови	Количество тромбоцитов	10, 12
2	AAR (AST/ALT ratio)	Включает АСТ и АЛТ	7, 16
3	AP index (age & platelet index)	Возраст (годы): < 30 = 0; 30-39 = 1; 40-49 = 2; 50-59 = 3; 60-69 = 4; ≥ 70 = 5 Тромбоциты (10 ⁹ /л): ≥ 225 = 0; 200-224 = 1; 175-199 = 2; 150-174 = 3; 125-149 = 4; < 125 = 5 Итоговая величина варьирует от 0 до 10	15
4	CDS (cirrhosis discriminant score)	Тромбоциты (10 ⁹ /л): > 340 = 0; 280-339 = 1; 220-279 = 2; 160-219 = 3; 100-159 = 4; 40-99 = 5; < 40 = 6 АЛТ/АСТ: > 1,7 = 0; 1,2-1,7 = 1; 0,6-1,19 = 2; < 0,6 = 3 INR (МНО): < 1,1 = 0; 1,1-1,4 = 1; > 1,4 = 2 Итоговая величина варьирует от 0 до 11	4
5	APRI (AST/platelet ratio index)	Включает АСТ и тромбоциты	18
6	FI (fibrosis index)	Включает тромбоциты и альбумин	11
7	Pohl score	Фиброз есть, если АСТ/АЛТ ≥ 1,0 и количество тромбоцитов < 150 x 10 ⁹ /л	14
8	Forns index	Включает тромбоциты, гамма-глутамилтранспептидазу (ГГТП), возраст, холестерол	6
9	HEPAscore	Включает 4 маркера (билирубин; ГГТП; альфа2-макроглобулин; гиалуроновая кислота), а также возраст и пол пациента	1
10	SHASTA index	Включает 3 маркера (гиалуроновая кислота, АСТ, альбумин)	9
11	5-маркерный индекс	Включает 5 маркеров (альфа2-макроглобулин, общий билирубин, ГГТП, гаптоглобин, аполипопротеин А1)	8
12	FibroSpect II (Prometheus Laboratories, USA)	Включает альфа2-макроглобулин, TIMP-1 и гиалуроновую кислоту	13

что технически усложняет и существенно повышает стоимость лабораторного анализа.

Учитывая вышеперечисленные недостатки, мы считали необходимым условием при создании собственной прогностической модели неинвазивной диагностики фиброза печени у больных ХВГ следующие критерии:

1) использование информативных, но при этом относительно простых биохимических, «рутинных» тестов;

2) визуализация значений конкретных показателей в одном интегральном индексе, который в определенных диапазонах позволит диагностировать фиброз печени на уровне отдельных стадий (F0, F1/2, F3, F4) и возможных переходных состояний (F2 → F3, F3 → F4).

Для разработки метода (заявка на патент «Способ диагностики фиброза печени» № 2007118845, приоритет от 21.05.2007) был сформирован «обучающий» массив, состоящий из здоровых волонтеров без признаков фиброза (F0, n = 37) и 126 обследованных нами больных ХВГ с начальным (F1/2, n = 40) и распространенным (F3, n = 39) фиброзом, а также с морфологически документированным циррозом печени (F4, n = 47).

При создании прогностической модели использовали множественный, линейный, пошаговый регрессионный анализ биохимических показателей с последовательным их включением/исключением при уровне порогов вероятностей, равном 0,05. В результате было получено уравнение множественной регрессии (патентное «ноу-

ТАБЛИЦА 5. ПОРОГОВЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ДИАПАЗОНЫ ИНТЕГРАЛЬНОГО ИНДЕКСА ФИБРОЗА (ИИФ), ЗНАЧИМЫЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СТАДИИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Стадии фиброза	ИИФ	SN	SP
Признаков фиброза нет (F0)	< 2,30	65%	71%
Начальные стадии фиброза (F1/F2)	≥ 2,30 – ≤ 2,66	90,9%	84,6%
Распространенный фиброз/цирроз (F3/F4)	≥ 2,84	80,8%	90,9%
В том числе, стадия F3	≥ 2,84 – ≤ 3,04	62,5%	92,8%
В том числе, стадия F4/цирроз	≥ 3,38	82,1%	83,3%

Примечание: SN – чувствительность и SP – специфичность признака.

хау»), которое позволяло на основе 5 биохимических параметров (ПТИ, глюкоза, альбумин, АСТ, ЛДГ) рассчитать интегральный индекс фиброза (ИИФ) индивидуально для всех обследованных лиц из «обучающего» массива. На основе квантильного разбиения значений ИИФ, полученных во всей выборке больных ХВГ и здоровых волонтеров, были выделены достоверно отличающиеся между собой пороговые значения и диапазоны, характерные для определенных морфологических стадий фиброза (табл. 5). Кроме того, были определены интервалы значений ИИФ, маркирующие переходные состояния из F2 в F3 стадию (ИИФ > 2,66 – < 2,84), а также из F3 в F4 стадию (ИИФ > 3,04 – < 3,38).

На завершающем этапе разработки была создана компьютерная программа, которая после ввода всех переменных значений (ПТИ, глюкоза, альбумин, АСТ, ЛДГ) в автоматическом режиме проводит процедуру нормирования/центрирования показателей и их соответствующую математическую обработку, после чего результат экспер-

тизы выводится на дисплей или на печать в виде заключения, где представлена величина ИИФ и соответствующая ей морфологическая стадия фиброза печени.

Диагностическую точность предложенной модели исследовали на «экзаменационном» массиве, в который вошли 84 больных ХВГ, обследованных во второй половине 2007 года. «Экзаменационная» группа состояла из 62 мужчин и 22 женщин в возрасте от 21 до 58 лет (средний возраст 33 года). Моноинфекция вирусом гепатита С или В была выявлена соответственно у 72 (65,5%) и 17 (20,2%) больных, в оставшихся 14,3% случаев (12/84) регистрировались смешанные формы инфицирования (С+В, С+В+D). Клинические проявления цирроза печени были выявлены в 29,8% случаев (у 25 из 84 больных). Биохимический анализ крови проводили на момент поступления больного в стационар, до начала комплексной терапии и пункционной биопсии печени. Для неинвазивной диагностики фиброза печени на экспертизу сообщалась информация

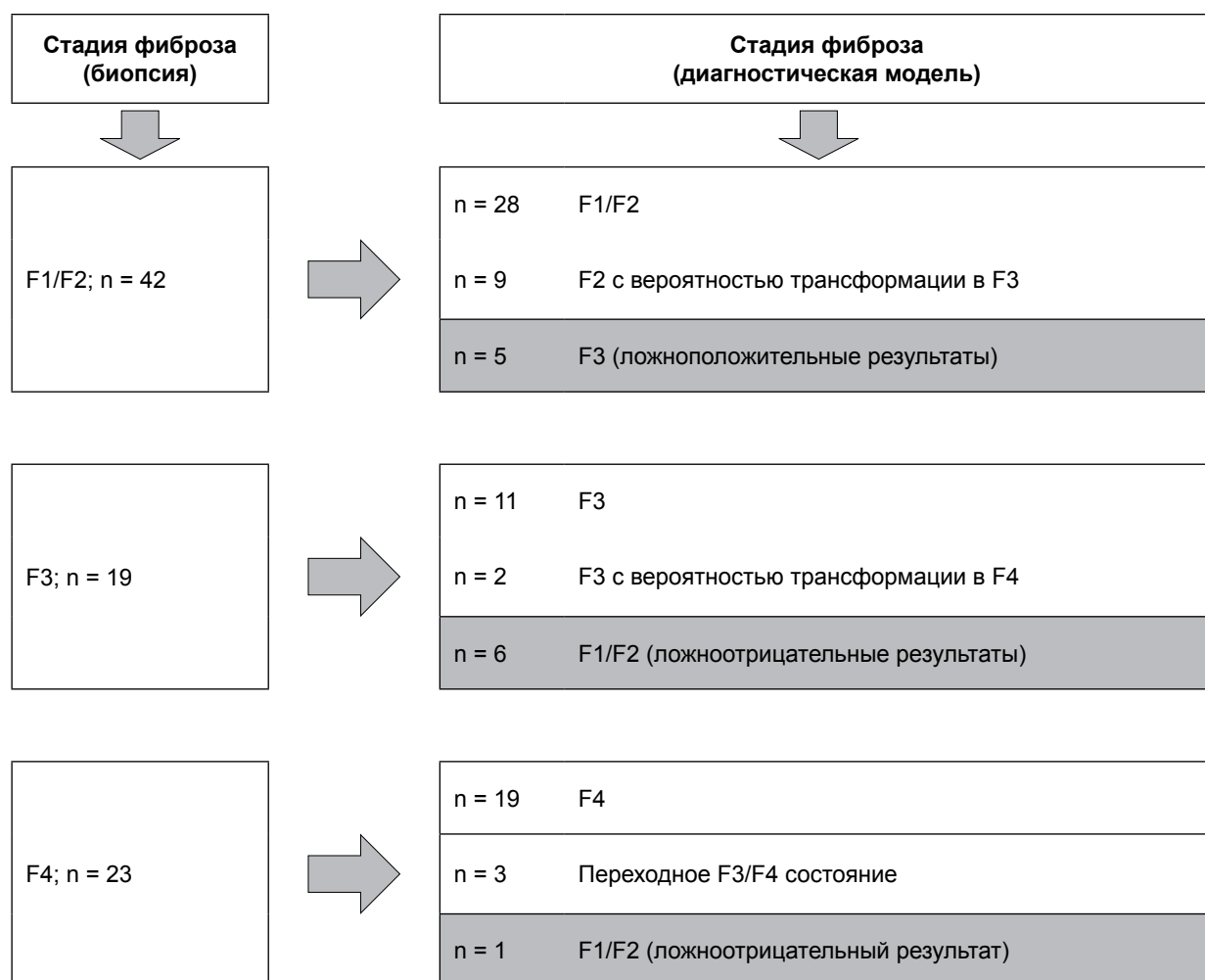


Рисунок 2. Эффективность прогностической модели в диагностике стадии фиброза печени у больных ХВГ «экзаменационного» массива (n = 84)

только по 5 параметрам (ПТИ, уровень глюкозы, альбумина, АСТ, ЛДГ).

По результатам гистологического исследования биоптатов печени в «экзамнационной» группе F1/F2 стадия фиброза была выявлена у 42 (50%), F3 у 19 (22,6%) и F4 у 23 (27,4%) больных ХВГ. В подгруппах больных с F1/F2, F3 и F4 стадией фиброза медианные значения ИИФ составили 2,56 (LQ-UQ 2,22-2,73), 2,73 (2,54-2,94) и 3,57 (3,27-4,11), соответственно. Величина ИИФ прямо коррелировала с гистологической стадией фиброза печени ($r_s = 0,68$; $p < 0,000001$).

Результаты неинвазивной диагностики степени тяжести фиброза у 72 из 84 больных «экзамнационного» массива совпали с результатами морфологической оценки биоптатов печени, что указывает на высокую (на уровне 86%) диагностическую точность предложенного подхода (рис. 2). Из 12 случаев ошибочной диагностики у 8,3% (7/84) больных были получены ложноотрицательные результаты — диагностика начальных (F1/F2) стадий, тогда как морфологически определялся распространенный фиброз (F3, $n = 6$) или цирроз (F4, $n = 1$). В 6,0% случаев (5/84 больных) были получены ложноположительные результаты — вместо начальных (F1/F2) стадий диагностировался фиброз печени на стадии F3.

Таким образом, предлагаемый подход позволяет, не прибегая к пункционной биопсии печени, с высокой (86%) диагностической точностью оценить степень тяжести фиброза у больных ХВГ. Следует отметить очевидные преимущества неинвазивной диагностики фиброза печени: 1) исследование безопасно для больного и может проводиться с более короткими временными интервалами, чем биопсия печени; 2) исследование доступно для учреждений практического здравоохранения, поскольку базируется на «рутинных» биохимических тестах; 3) предлагаемый подход позволяет оценивать переходные состояния между различными стадиями фиброгенеза (трансформация из F2 в F3, или из F3 в F4 стадию).

В дальнейшем нами планируется оценить возможность использования разработанной прогностической модели для мониторинга развития фиброза у больных ХВГ при оценке эффективности комплексной, противовирусной и антифиброзной терапии.

Благодарности

Авторы статьи благодарны д.м.н. Никонову С.Д. и к.м.н. Кожевникову Ю.А. за высокий профессионализм при выполнении биопсии печени, а также д.м.н. Филимонову П.Н. за качественную морфологическую оценку биоптатов.

Список литературы

1. Adams L.A., Bulsara M., Rossi E., DeBoer B., Speers D., George J., Kench J., Farrell G., McCaughan G.W., Jeffrey G.P. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection // Clin. Chem. — 2005. — Vol. 51, N 10. — P. 1867-1873.
2. Bataller R., Brenner D.A. Liver fibrosis // Clin. Invest. — 2005. — Vol. 115. — P. 209-218.
3. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group // Hepatology. — 1996. — Vol. 24. — P. 289-293.
4. Bonacini M., Hadi G., Govindarajan S., Lindsay K.L. Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection // Am. J. Gastroenterol. — 1997. — Vol. 92. — P. 1302-1304.
5. Bravo A.A., Sheth S.G., Chopra S. Liver biopsy // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344. — P. 495-500.
6. Forns X., Ampurdanès S., Llovet J.M., Aponte J., Quintó L., Martínez-Bauer E., Bruguera M., Sánchez-Tapias J.M., Rodés J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model // Hepatology. — 2002. — Vol. 36. — P. 986-992.
7. Giannini E., Risso D., Botta F., Chiarbonello B., Fasoli A., Malfatti F., Romagnoli P., Testa E., Ceppa P., Testa R. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease // Arch. Intern. Med. — 2003. — Vol. 163. — P. 218-224.
8. Imbert-Bismut F., Ratziu V., Pieroni L., Charlotte F., Benhamou Y., Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study // Lancet. — 2001. — Vol. 357. — P. 1069-1075.
9. Kelleher T.B., Mehta S.H., Bhaskar R., Sulkowski M., Astemborski J., Thomas D.L., Moore R.E., Afdhal N.H. Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV co-infected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index // J. Hepatology. — 2005. — Vol. 43. — P. 78-84.
10. Lu S.N., Wang J.H., Liu S.L., Hung C.H., Chen C.H., Tung H.D., Chen T.M., Huang W.S., Lee C.M., Chen C.C., Changchien C.S. Thrombocytopenia as a surrogate for cirrhosis and a marker for the identification of patients at high-risk for hepatocellular carcinoma // Cancer. — 2006. — Vol. 107, N 9. — P. 2212-2222.
11. Ohta T., Sakaguchi K., Fujiwara A., Fujioka S., Iwasaki Y., Makino Y., Araki Y., Shiratori Y. Simple surrogate index of the fibrosis stage in chronic hepatitis C patients using platelet count and serum albu-

min level // *Acta Med. Okayama.* — 2006. — Vol. 60, N 2. — P. 77-84.

12. Ono E., Shiratori Y., Okudaira T., Imamura M., Teratani T., Kanai F., Kato N., Yoshida H., Shiina S., Omata M. Platelet count reflects stage of chronic hepatitis C // *Hepatol Res.* — 1999. — Vol. 15. — P. 192-200.

13. Patel J., Gordon S.C., Oh E., Smith K., McHutchison J.G. A non-invasive panel of serum fibrosis markers can reliably differentiate hepatitis C patients with minimal fibrosis from those with fibrosis stages F2-F4 // 53rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. — Boston, 2002, [abstract 770].

14. Pohl A., Behling C., Oliver D., Kilani M., Monson P., Hassanein T. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection // *Am. J. Gastroenterol.* — 2001. — Vol. 96. — P. 3142-3146.

15. Poynard T., Bedossa P., METAVIR and CLIN-IVIR cooperative studygroups. Age and platelet count:

a simple index for predicting the presence of histological lesions in patients with antibodies to hepatitis C virus // *J. Viral. Hepatol.* — 1997. — Vol. 4. — P. 199-208.

16. Sheth S.G., Flamm S.L., Gordon F.D., Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection // *Am. J. Gastroenterol.* — 1998. — Vol. 93. — P. 44-48.

17. Strader D.B., Wright T., Thomas D.L., Seeff L.B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C // *Hepatology.* — 2004. — Vol. 39. — P. 1147-1171.

18. Wai C.T., Greenson J.K., Fontana R.J., Kalbfleisch J.D., Marrero J.A., Conjeevaram H.S., Lok A.S. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C // *Hepatology.* — 2003. — Vol. 38. — P. 518-526.

поступила в редакцию 28.02.2008

принята к печати 17.03.2008