

ФАКТОРЫ РОСТА В ОЦЕНКЕ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

Ивкова А. Н., Ильченко Л. Ю., Кушлинский Н. Е., Петренко Н. В.**, Сторожаков Г. И.***

Кафедра госпитальной терапии № 2 лечебного факультета Российского государственного медицинского университета, Москва

* Лаборатория биохимических исследований Российского онкологического научного центра РАМН, Москва

** Городская клиническая больница № 12 Департамента здравоохранения, Москва

РЕЗЮМЕ

В настоящее время имеется существенная необходимость в поиске неинвазивных методик мониторинга воспалительной активности и фиброза печени у пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС). Впервые определены сывороточные концентрации основного фибробластного фактора роста (FGF-b), фактора роста гепатоцитов (HGF) и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) у здоровых лиц и пациентов с ХГС.

В результате проведенной работы выявлено повышение концентрации FGF-b и HGF в сыворотке крови по мере возрастания фиброза.

Полученные результаты позволяют рекомендовать определение данных факторов роста в клинической практике в качестве дополнительных неинвазивных маркеров фиброза печени.

Ключевые слова: хронический гепатит С, фиброз печени, факторы роста.

ВВЕДЕНИЕ

Хронический гепатит С (ХГС) остается одной из актуальнейших проблем здравоохранения во всем мире. Растущая распространенность вируса гепатита С (ВГС), трудность диагностики на ранних стадиях заболеваний, ассоциированных с ВГС, прогрессирующее течение, развитие осложнений, недостаточная эффективность проводимой противовирусной терапии делают необходимым дальнейшее изучение патогенеза ХГС, совершенствование методов его распознавания и лечения [1, 3]. Одним из направлений изучения ВГС является исследование механизмов развития фиброза, разработка методов предотвращения его прогрессирования как возможной точки приложения в терапии гепатитов и предотвращении необратимых изменений печени. Накоплены научные данные, отражающие не только понимание молекулярных основ развития фиброза, но также и методов его диагностики. Во всем мире изучается роль различных факторов роста (ФР) в развитии фиброза, механизмы их взаимодействия с другими регуляторными системами организма, предпринимаются попытки воздействия на эти цитокины [2, 4, 6, 10, 15].

Цитокины принимают участие в регуляции воспалительной реакции печеночной ткани, апоптоза и некроза клеток печени, а также в развитии

холестаза и фиброза. Но, как это ни парадоксально, данные цитокины также являются медиаторами регенерации поврежденной ткани [15].

Кроме того, предпринимаются активные попытки определения концентрации цитокинов, в том числе и ростовых факторов, с целью мониторинга выраженности фиброза, определения прогноза заболевания ХГС. К сожалению, до настоящего времени у здоровых лиц не определены сывороточные концентрации фактора роста гепатоцитов, инсулиноподобного фактора роста-1, основного фибробластного фактора. Пункционная биопсия печени (ПБП) все еще остается «золотым стандартом» диагностики фиброза. Однако возможности ПБП ограничены: сложность забора материала, наличие противопоказаний для проведения, обусловленных тяжестью состояния пациента, возможные осложнения, вплоть до летального исхода, высокая стоимость исследования делают необходимым поиск и внедрение в практику неинвазивных маркеров фиброза и воспалительной активности с применением тестов, в которых использовалась бы периферическая кровь.

Основу таких тестов составляют методы выявления молекулярных соединений, участву-

ющих в образовании внеклеточного матрикса или являющихся активаторами/ингибиторами фиброгенеза.

Все вышеизложенное и определило цель настоящей работы: оценить диагностическую значимость факторов роста (HGF — фактор роста гепатоцитов, FGF-b — основной фибробластный фактор и IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста) у больных с хронической ВГС-инфекцией как маркеров воспалительной активности и фиброза, а также определить сывороточную концентрацию ФР у здоровых лиц.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 50 пациентов с ХГС и С-индуцированным циррозом печени (ЦПС), находившихся на обследовании и лечении в отделении гастроэнтерологии ГКБ № 12 Москвы (кафедра госпитальной терапии № 2, РГМУ).

Группу обследованных больных ХГС составили 31 (62%) мужчина и 19 (38%) женщин в возрасте от 17 до 55 лет (средний возраст $34,5 \pm 9,72$ года). В исследование не включались пациенты, злоупотреблявшие алкоголем и наркотическими средствами, пациенты с аутоиммунными заболеваниями, с выраженным ожирением ($ИМТ > 30 \text{ кг/м}^2$), а также больные с сопутствующей заболеваниями в стадии декомпенсации и наличием других гепатотропных вирусов.

Пациенты обследованы по единому плану, которые в соответствии с задачами настоящего исследования предусматривали проведение физикального, клинко-биохимических и инструментальных (УЗИ органов брюшной полости, ЭГДС) исследований; ПБП; определение содержания факторов роста FGF-b, HGF, IGF-1 в сыворотке крови.

Диагноз хронической ВГС-инфекции устанавливался на основании комплексного анализа: данных физикального и лабораторного обследований, результатов дополнительного исследования, включая вирусологическое обследование (выявление в сыворотке крови anti-HCV, HCV-RNA и генотипа). Маркеры инфекции определялись иммуноферментным методом (тест — наборы *Human*, Германия) по стандартной методике. Исследование HCV-RNA (ПЦР) в сыворотке крови производилось методом полимеразной цепной реакции в ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ.

ПБП проводилась всем пациентам, включенным в исследование. Лишь в двух случаях с ЦПС класс В по Чайлд-Пью ПБП не проводилась. Морфологическое исследование гепатобиоптатов печени проводилось в патологоанатомическом отделении ГКБ № 12 (зав. отделением Н. В. Петренко). Гистологическая картина изменений печени оценивалась по методу, предложенному Knodell и по шкале *MetaVIR* (ИГА — индекс гистологической актив-

ности, СГА — степень гистологической активности и индекс фиброза — ИФ соответственно) [3, 9].

Определение концентрации факторов роста в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов *BioSource Int.* (Бельгия) согласно прилагаемой инструкции на иммуноферментном анализаторе *Multiscan* (Финляндия). Расчет количества ФР производили путем построения калибровочной кривой, количество выражали в пг/мл (HGF, FGF-b) и нг/мл (IGF-1). Исследование проводилось в биохимической лаборатории РОНЦ РАМН (зав. лабораторией — проф., членкор РАМН Н. Е. Кушлинский).

Контрольную группу составили 28 практически здоровых лиц в возрасте от 16 до 59 лет (средний возраст $35,9 \pm 11,5$ года), из них 14 мужчин и 14 женщин. Всем обследованным в контрольной группе проводился контроль общего, биохимического, иммунологического анализов крови, исследования маркеров HCV- и HBV-инфекции.

Статистическая обработка данных осуществлялась на компьютере с помощью программ *Excel 7,0* и *Statistica 6,0* с использованием непараметрических характеристик ($p < 0,05$) — медианы (*Me*), интерквартильного размаха (ИКР) и анализа по *Anova* по Краскелу — Уоллису, медианного критерия, критерия Манна — Уитни при сравнении двух групп, а также корреляционного анализа по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенного обследования пациенты были разделены на группы:

- первую группу составили 14 больных с ХГС и ИФ-1 по шкале *MetaVIR*;
- во вторую группу вошли 20 человек с ИФ-2 по шкале *MetaVIR*;
- в третью группу — 9 пациентов с ИФ-3, у 4 больных данной группы на основании морфологического исследования установлен диагноз ЦП без клинически выраженных признаков портальной гипертензии.

Кроме того, нами была выделена группа из 5 больных с отсутствием фиброза по данным морфологического исследования (ИФ-0). Несмотря на малочисленность группы, ее выделение, на наш взгляд, было необходимо, так как сывороточные ФР у пациентов с ХГС ранее не определялись.

У всех пациентов определялась гистологическая картина, характерная для ХГС: лимфоидные фолликулы в паренхиме, умеренно выраженный

ПОКАЗАТЕЛИ ФАКТОРОВ РОСТА (HGF, IGF-1, FGF-b) У ОБСЛЕДОВАННЫХ БОЛЬНЫХ ХГС

ФР	Статистические показатели	ИФ-0 (n = 5)	1-я группа (n = 14)	2-я группа (n = 20)	3-я группа (n = 9)	Всего (n = 48)	Контроль (n = 28)
HGF, пг/мл	Медиана	609,82	603,039	713,943	1576,06	732,834	333,436
	ИКР (25–75%)	569,23–743,17	518,781–743,168	485,373–1099,85	966,525–1856,77	535,559–1112,380	59,5–703,632
IGF-1, нг/мл	Медиана	215,42	282,076	317,269	312,012	299,5950	171,5
	ИКР (25–75%)	178,84–338,11	231,322–352,387	267,886–359,714	112,523–481,238	231,322–365,69	165,5–309,691
FGF-b, пг/мл	Медиана	2,733	2,6015	5,586	7,0280	4,342	0,901
	ИКР (25–75%)	2,205–3,532	0,901–3,532	3,402–9,378	4,342–10,158	2,205–8,615	0,643–2,468

лобулярный гепатит, скопление лимфоцитов в виде цепочек в перисинусоидальных пространствах Диссе, жировая инфильтрация, реакция эпителия желчных канальцев.

ИФ составил в среднем по шкале *MetaVIR* 2,067 ± 0,99 балла, ИГА по Knodell — 8,97 ± 7 балла, а по шкале *MetaVIR* — 1,66 ± 0,66 балла. В нашем исследовании оценка гистологической активности по Knodell и по *MetaVIR* не выявила существенных различий и оказалась практически идентичной ($p > 0,05$).

Обращает внимание, что высокие градации фиброза печени (ФП) сопровождалась ростом степени гистологической активности в зависимости от выраженности фиброза. Наши результаты согласуются с данными зарубежных исследований [7, 9], в которых авторы указывают на большую частоту выявления высоких градаций ИГА при значительно повышенных значениях ИФ.

Синдром цитолиза наблюдался у 89,4% пациентов, включенных в исследование. Уровень трансаминаз (ТА) у 5 больных (11,6%) не превышал нормальных значений. У 30 (69,7%) пациентов уровень повышения активности АЛТ не превышал 4 норм, что соответствует минимальной степени, при этом у большинства из них (55,8%) определялись умеренные и более высокие градации ФП. При сравнении лабораторных показателей в исследуемых группах значения цитолитического синдрома имели тенденцию к росту по мере прогрессирования степени фиброза. Однако при корреляционном анализе по Спирмену отсутствовала достоверная взаимосвязь уровня ТА со степенью воспалительной активности и со стадией ФП. Полученные данные свидетельствуют, что уровень гиперферментемии не является стабильной величиной и, скорее, отражает степень выраженности воспалительной реакции в ответ на повреждающие агенты, а вследствие этого не может являться маркером ФП.

В таблице представлены результаты исследования концентрации ФР в сыворотке крови больных с ВГС-инфекцией.

Как видно из представленной таблицы, в группе обследованных пациентов с ВГС-инфекцией уров-

ни ФР существенно превышали соответствующие значения в контрольной группе ($p < 0,01$), что свидетельствует об активном участии цитокиновой системы в фиброгенезе и воспалительных процессах в печени. Полученные нами результаты не противоречат данным литературы [6].

Следует отметить, что показатели IGF-1 в 3-й группе пациентов были неоднозначными. У больных с выраженной степенью фиброза (ИФ-3) показатели IGF-1 превышали значения контрольной группы, тогда как у пациентов с ЦПС (ИФ-4) они оказались ниже нормы. Возможно, изменения сывороточной концентрации IGF-1 при прогрессировании ФП обусловлены уменьшением количества функционирующих гепатоцитов, являющихся основным источником этого фактора, а также снижением биодоступности IGF-1. По данным литературы, уровень IGF-1 уменьшается при хронических заболеваниях печени, однако сведения о механизмах влияния IGF-1 на гепатоциты ограничены и противоречивы [8, 10]. С одной стороны, он является регулятором активации звездчатых клеток — ЗК (а значит, уровень IGF-1 при прогрессировании ФП должен возрастать), а с другой — стимулирует синтез HGF и угнетает экспрессию трансформирующего фактора роста β (TGF- β) — основного фибробластного фактора, то есть данный фактор обладает регуляторными свойствами, вследствие этого его концентрация изменяется от максимально высокой до максимально низкой, что и было показано при исследовании у больных 3-й группы [5, 10, 13].

При сравнительном анализе сывороточных ФР установлено, что показатели HGF ($p < 0,0001$) и FGF-b ($p < 0,0004$) также отличались в исследуемых группах (рис. 1 и 2). Отмечалась тенденция к росту концентраций данных ФР при прогрессировании ФП. Уровень HGF возрастает при прогрессировании заболевания за счет активации ЗК, являющихся основными фиброгенными клетками и источником HGF [16]. Увеличение концентрации HGF по мере прогрессирования ФП обусловлено репаративными процессами в ткани печени и синтезом данного фактора активными ЗК [11]. Однако

не исключается вариант снижения протеолиза HGF при ЦП [9]. Синтез FGF-2 также возрастает при прогрессировании ФП, так как данный фактор является активатором ЗК. Следует учитывать антифиброгенное действие ФР гепатоцитов и его роль в процессах программируемой клеточной смерти [12].

Нами установлено, что уровень FGF-2 отличался в группе больных с ХГС с нормальным уровнем ТА по сравнению с группой пациентов с повышенным уровнем ТА ($p < 0,05$). Подобные результаты ожидаемы, поскольку ФР участвуют в механизмах ФП.

При сопоставлении сывороточных концентраций ФР с вирусологическими характеристиками (уровень вирусологической нагрузки, генотип ВГС) статистически значимых результатов получено не было ($p > 0,05$).

Также не было получено достоверных взаимосвязей с полом и возрастом пациентов ($p > 0,05$).

Следующим этапом нашей работы была оценка клинической информативности сывороточных концентраций ФР. С этой целью проводился корреляционный анализ по Спирмену между стандартными клинико-лабораторными, морфологическими показателями ХГС и концентрацией ФР.

Ниже приводятся результаты проведенного корреляционного анализа.

Статистически значимых взаимосвязей между клиническими синдромами (астено-вегетативный, диспепсический, болевой) и концентрацией ФР получено не было ($p > 0,05$). Также не было выявлено достоверных взаимосвязей между сывороточными ФР и показателями общего (за исключением тромбоцитов) и биохимического (за исключением билирубина) анализов крови ($p > 0,05$).

В общей группе пациентов уровень HGF коррелировал с ИФ ($r = 0,5438$, $p = 0,0001$) и ИГА ($r = 0,3601$, $p = 0,0152$). Данная связь носила прямой характер, что может быть объяснено механизмами действия этого фактора. При трансформации ЗК начинают

синтезировать продукты экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) и профиброгенные цитокины, которые наряду с синтезом ЭЦМ запускают процессы репарации, основная роль в которых принадлежит ФР гепатоцитов [15].

Также отмечалась положительная корреляция с количеством тромбоцитов ($r = 0,3236$, $p = 0,0301$) и уровнем билирубина ($r = 0,4536$, $p = 0,00621$). Нами показано, что с количеством тромбоцитов корреляционная связь имела обратный характер ($r = -0,3230$, $p = 0,0304$). О механизмах взаимодействия HGF и тромбоцитов известно мало. Данная взаимосвязь, вероятно, носит опосредованный характер, вследствие гиперспленизма, характерного для длительно текущих заболеваний печени, в частности ХГС. Кроме того, данный фактор способен регулировать (стимулировать) синтез тромбопоэтина, уровень которого снижается при ЦП [17]. Корреляция с содержанием билирубина, вероятно, носит также опосредованный характер — нарастание гипербилирубинемии является признаком прогрессирующего поражения печени, а уровень повышения HGF пропорционален уровню выраженности ФП и гистологической активности [14].

При внутрigrupповом анализе наличие корреляционных связей оказалось несколько иным. Во всей группе у пациентов с минимальным и умеренным фиброзом HGF коррелировал с IGF-1, однако при дальнейшем анализе аналогичная корреляция определялась лишь у больных с умеренным фиброзом. У пациентов с минимальным ФП не установлено достоверных корреляционных взаимосвязей с ФР.

Во 2-й группе пациентов уровень HGF коррелировал с морфологическими показателями: ИФ ($r = 0,2213$, $p = 0,0348$), ИГА ($r = 0,5328$, $p = 0,01558$) и IGF-1 ($r = 0,5328$, $p = 0,0156$). О взаимосвязях ФР

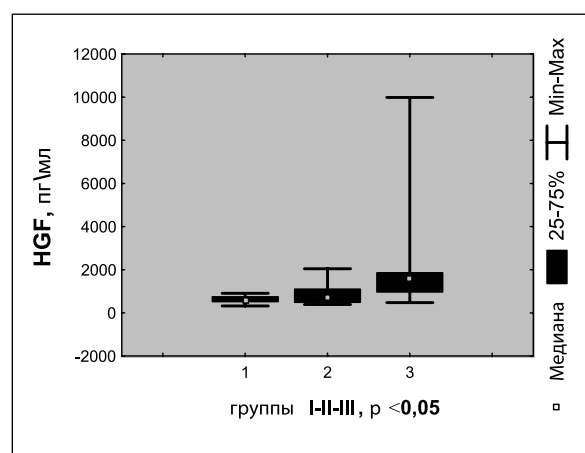


Рис. 1. Сывороточные концентрации HGF в исследуемых группах.

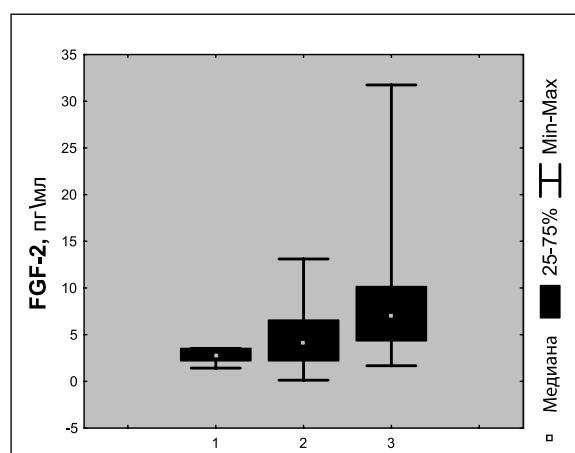


Рис. 2. Сывороточные концентрации FGF-2 в исследуемых группах.

с морфологическими показателями мы писали выше. В литературе обсуждаются корреляционные взаимосвязи этих ФР [11, 13]. На наш взгляд, подобная закономерность объяснима изменением темпа синтеза ФР и их соотношением на различных стадиях ФП.

В 3-й группе пациентов концентрация HGF ассоциировалась только с уровнем билирубина ($r = 0,7078$, $p = 0,0148$).

Содержание IGF-1 в общей группе коррелировало лишь с ИГА ($r = -0,3494$, $p = 0,0187$). У больных ЦПС концентрация IGF-1 коррелировала с уровнем билирубина и гепатоспленомегалией ($r = -0,6059$, $p = 0,0482$; $r = -0,6742$, $p = 0,0229$ соответственно). Следует отметить, что в этих случаях связь носила обратный характер, что, возможно, обусловлено снижением синтеза инсулиноподобного ФР при прогрессировании ЦПС [8]. С другими показателями в исследуемых группах достоверных взаимосвязей выявлено не было.

При проведении корреляционного анализа установлена сильная корреляционная связь концентрации FGF-b с ИФ во всех исследуемых группах ($p < 0,05$), кроме группы пациентов со слабой степенью фиброза, где значения этого ФР приближались к норме. На наш взгляд, полученный результат очень важен, так как открывает перспективы применения FGF-b для оценки ФП в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апросина, З. Г. Хронический вирусный гепатит/З. Г. Апросина, В. В. Серов. — М.: Медицина, 2002. — С. 9–10.
2. Шаниро, И. Я. Особенности иммунного ответа и цитокиновый статус при различных вариантах течения цирроза печени/И. Я. Шаниро, Сек Ок Сун, Б. Е. Кноринг//Мед. иммунол. — 2002. — Т. 4, № 4–5. — С. 545–552.
3. Шерлок, Ш. Заболевания печени и желчных путей, 11-е изд./Ш. Шерлок, Д. Дули//UK: Blackwell Science Ltd., 2002. — P. 37–44, 305–316.
4. Arthur, M. J. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis/M. J. Arthur//Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2000. — Vol. 279. — P. 245–249.
5. Fujie, H. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis/H. Fujie, H. Yotsuyanagi, K. Moriya et al.//J. Med. Virol. — 1999. — Vol. 59. — P. 141–145.
6. Geerts, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells/A. Geerts//Seminars in Liver Disease. — 2001. — Vol. 21, № 3. — P. 311–335.
7. Ghany, M. G. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C/M. G. Ghany, D. E. Kleiner, H. Alter et al.//Gastroenterology. — 2003. — Vol. 124. — P. 97–104.
8. Okazaki, I. Extracellular matrix and the liver, approach to gene therapy; 1st ed./I. Okazaki, Y. Ninomiya, S. L. Friedman et al. — Orlando: Academic Press, 2003. — P. 100–110, 155–169, 405–430, 445–454.
9. Knodell, I. G. Histological grading and staging of chronic hepatitis/G. Ishak Knodell, A. Baptista, L. Bianchi et al.//J. Hepatol. — 1995. — Vol. 22. — P. 696–699.

ВЫВОДЫ

1. Были определены нормальные концентрации значений ФР в сыворотке здоровых лиц.
2. У всех пациентов с ВГС-инфекцией сывороточная концентрация HGF и FGF-b достоверно превышает показатели контрольной группы.
3. У больных с ХГС выявлено повышение концентрации HGF, FGF-b в сыворотке крови по мере возрастания степени фиброза и снижение уровня IGF-1 при ЦПС.
4. Установлена прямая сильная связь концентрации FGF-b в сыворотке крови с ИФ, что позволяет рекомендовать его определение в качестве дополнительного маркера ФП.

Таким образом, в результате проведенной нами работы охарактеризовано содержание трех ФР (HGF, IGF-1, FGF-b) в сыворотке крови больных с хронической ВГС-инфекцией; выявлена статистически значимая взаимосвязь концентрации ФР с основными клинико-биохимическими и морфологическими характеристиками ХГС; прослежена динамика концентрации ФР по мере прогрессирования фиброза печени. Полученные данные, несмотря на ограниченный объем исследований, свидетельствуют о клинической информативности определения сывороточной концентрации данных ФР и целесообразности использования этих показателей для дополнительной характеристики степени фиброза печени у пациентов с ХГС.

10. Parrott, J. A. Skinner autocrine interactions of keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit-ligand in the regulation of normal ovarian surface epithelial cells/J. A. Parrott, R. Mosher, G. Kim et al.//Endocrinology. — 2000. — Vol. 141, № 7. — P. 2532–2539.
11. Jukkola, T. FGF regulated gene-expression and neuronal differentiation in the developing midbrain-hindbrain region/T. Jukkola, L. Lahti, T. Naserke et al.//Developmental Biology. — 2006. — Vol. 297, № 1. — P. 141–157.
12. Mayo, M. J. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection/M. J. Mayo//Am. J. Sci. — 2002. — Vol. 325, № 3. — P. 135–148.
13. Sato, M. The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide/M. Sato, M. Kakubari, M. Kawamura et al.//Biochem. Pharmacol. — 2000. — Vol. 59. — P. 681–690.
14. Shiota, G. Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: clinical implications/G. Shiota, J. Okano, H. Kawasaki et al.//Hepatology. — 1995. — Vol. 21, № 1. — P. 106–112.
15. Tsubouchi, H. Prediction of outcome in fulminant hepatic failure by serum human hepatocyte growth factor/H. Tsubouchi, S. Kawakami, S. Hirono et al.//Lancet. — 1992. — Vol. 5. — P. 340–307.
16. Yamashita, K. Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the thrombopoietin mRNA expression in rat hepatocytes and cirrhotic rat livers/K. Yamashita [et al.]/J. Gastroenterol. Hepatol. — 2000. — Vol. 15, № 1. — P. 83–90.
17. Yoshikawa, A. Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration with prompt improvement of hyperbilirubinemia in hepatectomized cholestatic rats/A. Yoshikawa, T. Kaido, S. Seto//J. Surg. Res. — 1998. — Vol. 78, № 1. — P. 54–59.