

НОВЫЙ НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Щёктова А.П., Булатова И.А., Щёктова И.В.

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, e-mail: psmalf@ru

Цель исследования: изучить возможность диагностики выраженности фиброза печени с помощью доступных лабораторных тестов – количества тромбоцитов, уровня альбумина и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) в крови. Обследовано 70 пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС). Плотность печени определяли методом фиброэластометрии (Ehosens, Франция). Исследование тромбоцитов в крови проводили на гематологическом анализаторе (Medonic-620M), уровень альбумина – на биохимическом анализаторе Arhitect-4000 (набор «Вектор-Бест»), концентрацию ФНО- α изучали методом ИФА (набор «Вектор-Бест», Новосибирск, анализатор StatFax, США). По результатам фиброэластометрии у 25 больных фиброз отсутствовал (стадия F0), 32 пациента имели умеренный фиброз (F1-2), у 13 человек был выраженный фиброз (F3-4). Выявлена корреляционная связь высокой степени между данными эластометрии, тромбоцитами ($r=0,9$), альбумином ($r=0,9$) и ФНО- α ($r=0,89$). Чувствительность и специфичность тестов для дифференциации F0 и F1-4 по количеству тромбоцитов составила 100% и 77,8%, по концентрации альбумина – 96% и 73,3%, чувствительность по уровню ФНО- α достигла 100%, специфичность – 73,3%. Количество тромбоцитов, концентрация альбумина и ФНО- α могут эффективно применяться как неинвазивные доступные лабораторные показатели для исключения фиброза печени у больных ХГС.

Ключевые слова: фиброз печени, хронический гепатит С, тромбоциты, альбумин, фактор некроза опухоли-альфа.

NEWNON-INVASIVEMETHOD FOR DIAGNOSTIC OF LIVER FIBROSIS

Shchekotova A.P., Bulatova I.A., Shchekotova I.V.

Perm State Medical University. Academician EA Wagner Health Ministry of Russia, Perm, e-mail: psmalf@ru

Aim. To investigate the possibility of evaluation of liver fibrosis intensity in patients with liver lesion using available laboratory tests - the number of platelets, the level of albumin and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the blood. The study involved 70 patients with chronic hepatitis C (CHC). The liver density was measured using Fibroelastometry (Ehosens, France). The number of platelets was calculated on hematology analyzer (Medonic-620M), the albumin level investigate on the biochemical analyzer Arhitect-4000(set "Vector-Best") and the concentration of TNF- α was investigated by ELISA (a reagent kit of "Vector-Best", Novosibirsk, analyzer Stat-Fax, USA). Fibroelastometry demonstrated in 25 patients no fibrosis (F0 stage), in 32 patients - mild fibrosis (F1-2), in 13 patients – advanced fibrosis (F3-4). High level correlation between fibroelastometry data, platelets number ($r=0.9$), albumin ($r=0.9$) and TNF- α ($r=0.89$) levels was detected. Sensitivity and specificity of tests for differentiation of F0 and F1-4 in platelets was 100% and 77.8%, in albumin level 96% and 73.3% accordingly, in TNF- α sensitivity reached 100% and specificity – 73.3%. The number of platelets, the concentration of albumin and TNF- α can be effectively used as a non-invasive, available indicators for the liver fibrosis exclusion in patients with CHC.

Keywords: liver fibrosis, chronic hepatitisC, platelets, albumin, tumor necrosis factor-alfa.

Фиброз печени (ФП) сопровождает течение всех хронических диффузных заболеваний печени и является достоверным признаком прогрессирования поражения органа. Именно поэтому определение стадии фиброза является прогностически значимым и используется в клинической практике как один из важных критериев для определения тактики ведения больных, что особенно актуально при хронических вирусных гепатитах [3]. На протяжении десятилетий единственным методом оценки ФП оставалась биопсия. И в настоящее время морфологическое исследование биоптата печеночной ткани сохраняет статус «золотого стандарта» [11]. Тем не менее это инвазивный метод с определенным

процентом осложнений, объективными и субъективными ограничениями [6]. К неинвазивным методам оценки ФП относятся методы визуализации печени, в том числе ультразвуковая эластометрия (УЗЭ) печени. Результаты многих исследований и метаанализов подтвердили высокую диагностическую точность метода (более 80%). Но есть факторы, влияющие на диагностическую точность эластометрии, имеются и противопоказания [12]. Среди неинвазивных методов на первый уровень диагностики вышли лабораторные маркеры фиброза [1; 5; 10]. Они делятся на прямые, отражающие количество фиброзной ткани по анализу веществ, их составляющих, в том числе – гиалуроновую кислоту, и непрямые, отражающие активность воспалительного процесса и повреждения паренхимы, нарушение ее синтетической функции и, таким образом, позволяющие косвенно судить о наличии и выраженности ФП, к которым можно отнести показатели рутинных лабораторных печеночных тестов [4]. На основе комбинации непрямых лабораторных маркеров фиброза предложено более 20 различных индексов и шкал для диагностики стадии ФП [7; 8]. Наиболее распространенной является диагностическая панель тестов FibroTest-ActiTest (BioPredictive, Франция). Благодаря ее применению число биопсий печени сокращается на 46% [9]. Однако в России ее применение на сегодняшний день ограничено из-за высокой стоимости исследования. В связи с этим поиск безопасных, общедоступных и эффективных методик оценки фиброза печени остается актуальной проблемой современной гепатологии.

Цель исследования – изучить возможность доступных лабораторных тестов – количества тромбоцитов, уровня альбумина и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) в крови для диагностики выраженности ФП.

Материал и методы исследования. Были обследованы 70 пациентов (30 мужчин и 40 женщин) с ХГС, средним возрастом $36,0 \pm 6,7$ года. Сопоставимая по полу и возрасту, контрольная группа включала 30 практически здоровых лиц. Этиологическая верификация вирусного гепатита С проводилась методом иммуноферментного анализа (ИФА), а также с помощью полимеразной цепной реакции наборами реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Ультразвуковая эластография (УЗЭ) печени проводилась с помощью аппарата FibroScan (EchoSens, Франция), значения плотности печени выражены в кПа. Общий анализ крови исследовали на гематологическом анализаторе Medonic-620M (Швеция). Для исследования концентрации альбумина, а также других печеночных тестов использовали автоматический анализатор Architect-4000 (Abbott, США). Содержание ГК в сыворотке крови определяли методом ИФА на анализаторе StatFax (США) с использованием наборов реагентов. Концентрацию ФНО- α в сыворотке крови обследуемых лиц определяли

методом ИФА на приборе StatFax (США) с использованием наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft). Данные описывались с помощью среднего и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) и в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля). Для оценки значимости различий независимых групп применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводился с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистическая значимость уравнения регрессии оценивалась по критерию Фишера. Нулевая гипотеза отвергалась при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Для расчета пороговых значений и диагностической эффективности показателей, имеющих предикторную ценность, проводился ROC-анализ и расчет отношения шансов (QR). ROC-кривая отображает графически зависимость количества правильно верифицированных истинно положительных результатов от количества отрицательных и позволяет оценить эффективность тестов. Оценку графических моделей проводили по экспертной шкале значений площади под ROC-кривой (AreaUnderCurve) [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Для изучения влияния исследуемых факторов на скорость развития фиброза печени были комплексно проанализированы данные анамнеза всех больных ХГС и установлена предполагаемая длительность инфицирования, которая у пациентов с ХГС варьировала от 2 до 18 лет и в среднем составляла $5,96 \pm 3,49$ года. При сравнительном изучении предполагаемого периода инфицирования в зависимости от пола больных ХГС выявлены достоверные различия. У мужчин средняя длительность заболевания была короче и составляла $5,3 \pm 2,9$ года, у женщин – $6,5 \pm 2,8$ года ($p = 0,04$). Анализ длительности заболевания в зависимости от генотипов вируса не дал значимых различий ($p = 0,87$). Предполагаемая длительность инфекционного процесса у пациентов с HCV-1 варьировала от 2 до 18 лет, в среднем - $6,1 \pm 3,6$ года, у больных с HCV-2, 3 была от 2 до 15 лет, в среднем - $6,1 \pm 3,4$ года ($p = 0,87$).

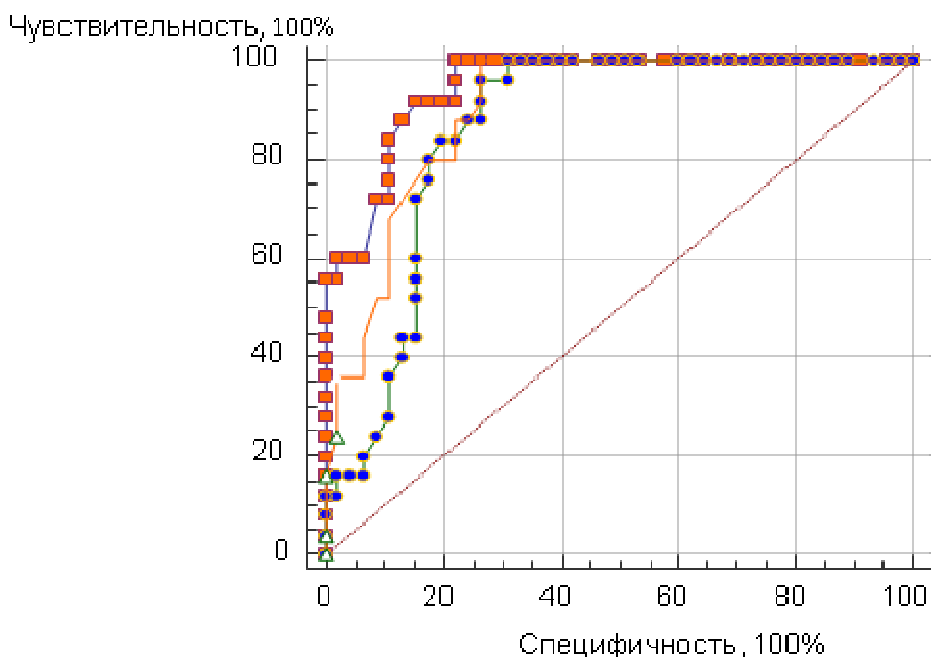
Для построения математической модели, учитывающей индивидуальную совокупность лабораторных предикторов прогрессирования фиброза и позволяющих установить стадию фиброза печени, был использован метод множественной регрессии. В качестве зависимой переменной выступала плотность печеночной ткани по данным УЗЭ, а в качестве предикторов (независимых переменных) – биохимические параметры и маркеры воспаления, имеющие статистически значимую взаимосвязь с выраженностью фиброза. Решение уравнения позволяло получить прогнозируемое значение плотности печени,

именуемое в дальнейшем «индекс фиброза» (ИФ), и дифференцировать подгруппы с различными стадиями фиброза при ХГС. Оценка адекватности прогноза проводилась по четырехпольной таблице с расчетом показателей чувствительности и специфичности, а также показателей воспроизводимости и соответствия. Прогноз считался хорошим при чувствительности и специфичности $\geq 90\%$, воспроизводимости $\geq 75\%$, соответствии $\geq 90\%$, удовлетворительным – при чувствительности $\geq 80\%$, специфичности $\geq 75\%$, воспроизводимости $\geq 50\%$, соответствии $\geq 75\%$. Для возможности индивидуального использования значимых предикторов прогрессирования ФП при ХГС были построены ROC-кривые и рассчитаны диагностические характеристики для данных параметров.

По результатам УЗЭ, в группе из 70 пациентов с ХГС у 25 человек фиброза не было (F0), 32 больных имели умеренный ФП (F1-2), у 13 пациентов с ХГС наблюдался выраженный фиброз с переходом в цирроз печени (F3-4). Была установлена корреляционная связь высокой степени между плотностью печеночной ткани, по данным УЗЭ, с тремя лабораторными параметрами крови: тромбоцитами ($r=0,9$), альбумином ($r=0,9$) и ФНО- α ($r=0,89$). Оценка чувствительности и специфичности лабораторных предикторов прогрессирования фиброза печени зависит от выбранных оптимальных пороговых значений лабораторных тестов. Диагностику стадий фиброза печени при ХГС осуществляли с учетом оценки уровня прямого лабораторного маркера фиброза – ГК. При этом точка деления ГК для дифференциации стадии F0 от F1 - 4 – ≤ 32 при чувствительности и специфичности 91,8 и 93,2% соответственно. Стадия умеренного фиброза печени (F1 - 2) у больных ХГС устанавливается при уровне ГК в сыворотке крови, равном или более 32 нг/мл и менее 70,3 нг/мл, стадия выраженного фиброза (F3) - при содержании ГК в сыворотке, равном или более 70,3 нг/мл и менее 104,3 нг/мл. Стадия F4 при ХГС диагностируется при сывороточном уровне ГК более 104,3 нг/мл. Данный маркер обладает высокими операционными характеристиками, но использование его в условиях ограниченных ресурсов проблематично.

Для возможности индивидуального использования наиболее значимых из исследованных предикторов развития ФП нами были построены графики ROC-кривых для параметров тромбоцитов, альбумина и ФНО- α (рис.).

Площадь ROC-кривой тромбоцитов для прогнозирования риска прогрессирования ФП составила AUC $0,95 \pm 0,02$ (доверительный интервал 0,86-0,99), $p < 0,001$. Индекс Юдена для данного показателя равнялся 0,78.



ROC-кривые тромбоцитов, альбумина и ФНО-α; ○ – тромбоциты; Δ - альбумин; □ – ФНО-α

Пороговое значение тромбоцитов для дифференциации стадии F0 от F1-4 – $282 \times 10^9/\text{л}$ при чувствительности и специфичности 100 и 77,8% соответственно. Площадь ROC-кривой альбумина для прогнозирования риска прогрессирования ФП составила $AUC 0,86 \pm 0,04$ (доверительный интервал 0,76-0,93), $p < 0,001$. Индекс Юдена для альбумина равнялся 0,69. Пороговое значение альбумина для дифференциации стадии F0 от F1-4 – 47,3 г/л при чувствительности и специфичности 96 и 73,3% соответственно. Площадь ROC-кривой ФНО-α для прогнозирования риска прогрессирования ФП составила $AUC 0,90 \pm 0,03$ (доверительный интервал 0,80-0,96), $p < 0,001$. Индекс Юдена для данного показателя равнялся 0,73. Пороговое значение ФНО-α для дифференциации стадии F0 от F1-4 – 1,9 пг/мл при чувствительности и специфичности 100 и 73,3% соответственно. Таким образом, операционные характеристики изученных тестов близки по эффективности к диагностическим возможностям ГК в отношении выявления и стратификации фиброза печени.

Отсутствие фиброза печени у больных ХГС (F0) диагностируется при количестве тромбоцитов в крови более или равном $282 \times 10^9/\text{л}$, уровне альбумина в сыворотке более или равном 47,3 г/л и значении сывороточного ФНО-α менее или равном 1,9 пг/мл. Пороговые значения тромбоцитов, альбумина и ФНО-α для дифференциации стадий ФП при ХГС представлены в таблице.

Пороговые значения тромбоцитов, альбумина и ФНО-α для дифференциации стадий фиброза печени

Стадии ФП (F)	Значения показателей		
	Тромбоциты, *10 ⁹ /л	Альбумин, г/л	ФНО-α, пг/мл
F0 от F1-2	282	47,3	1,9
F1-2 от F3-4	200	44,1	2,8

Стадия умеренного ФП (F1-2) верифицируется при количестве тромбоцитов в крови более или равном $200 \times 10^9/\text{л}$ и менее $282 \times 10^9/\text{л}$, уровне альбумина более или равном 44,1 г/л и менее 47,3 г/л и значении ФНО-α более 1,9 пг/мл и менее или равном 2,8 пг/мл. Стадия выраженного ФП (F3-4) устанавливается при количестве тромбоцитов в крови менее $200 \times 10^9/\text{л}$, уровне альбумина в сыворотке менее 44,1 г/л и значении сывороточного ФНО-α более 2,8 пг/мл. С учетом установленных точек разделения возможно дифференцировать выраженный и умеренный ФП, а также определить его отсутствие у больных ХГС. Для сравнения: исследование чувствительности и специфичности индекса APRI, в который также входит определение количества тромбоцитов, в отношении диагностики преимущественно выраженного фиброза и цирроза показывает – 46-90% и 68-91% [8].

Был проведен ориентировочный расчет стоимости исследования трех тестов для оценки фиброза. Определение количества тромбоцитов составляет примерно 70 руб., уровня альбумина – 50 руб., концентрации ФНО-α – 100 руб., итого – 250 руб. Для сравнения: стоимость диагностической панели, основанной на непрямых маркерах фиброза, FibroTest-ActiTest (BioPredictive, Франция), для дифференциации стадий ФП составляет в среднем 200 евро [9].

Клинический пример. Больная Ш. 27 лет. В анамнезе ХГС в течение 7 лет, генотип 1, вирусная нагрузка высокая – $8,3 \times 10^6$ копий/мл. Пациентка направлена в городскую клиническую инфекционную больницу для проведения комбинированной противовирусной терапии. На момент осмотра пациентка предъявляла жалобы на снижение работоспособности. Кожа и склеры физиологической окраски, печень у края реберной дуги, селезенка не пальпируется, живот мягкий, безболезненный. Количество тромбоцитов в крови $250 \times 10^9/\text{л}$, концентрация ФНО-α в сыворотке крови 3 пг/мл, сывороточный уровень альбумина – 47,2 г/л. Показатели крови позволяют предположить умеренный фиброз (F1-2). Данные плотности печени по результатам УЗЭ: 7,8 кПа (стадия F2).

Заключение

Количество тромбоцитов, концентрация альбумина и ФНО-α могут эффективно применяться как непрямые, доступные показатели оценки фиброза печени у больных с ХГС

и стратифицировать стадии фиброза. Снижение количества тромбоцитов и альбумина ниже пороговых значений $282 \times 10^9/\text{л}$ и 47,3 г/л, а также повышение ФНО- α выше 1,9 могут служить предикторами фиброза печени. Для дифференциации фиброза F0 от F1-4 тесты имеют чувствительность 100–93,3% и специфичность 73,3–77,8%. Возможно применение данных тестов и для дифференциации умеренного и выраженного фиброза печени.

Список литературы

1. Вельков В.В. Сывороточные биомаркеры фиброза печени: до свидания биопсия? – М. : LomonosoffPrint, 2009. – 40 с.
2. Власов В.В. Эффективность диагностических исследований. – М. : Медицина, 1988. – 256 с.
3. Исаков В.А. Как определять выраженность фиброза печени и зачем? // Клиническая гастроэнтерология и гепатология. Русское издание. – 2008. – № 2. – С. 72–75.
4. Шептулина А.Ф. Неинвазивная диагностика фиброза печени: роль сывороточных маркеров / А.Ф. Шептулина, Е.Н. Широкова, В.Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2015. – № 2. – С. 28-40.
5. Щёктова А.П. Чувствительность и специфичность определения гиалуроновой кислоты, коэффициента де Ритиса и васкулоэндотелиального фактора роста для диагностики хронического гепатита и цирроза печени / А.П. Щёктова, И.А. Булатова, А.П. Ройтман // Пермский медицинский журнал. – 2013. – № 4. – Т. 30. – С. 84-89.
6. Bravo A.A. Liver biopsy / S.G. Sheth, S. Chopra // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 344 (7). – P. 495-500.
7. Leroy V. Diagnostic accuracy, reproducibility and robustness of fibrosis blood tests in chronic hepatitis C: a meta-analysis with individual data / V. Leroy, P. Halfon, Y. Bacq, J. Brechot, J. Boursier // Clin. Biochem. – 2008. – Vol. 41 (16-17). – P. 1368–1376.
8. Lin Z.H. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: an updated meta-analysis / Z.H. Lin, Y.N. Xin, Q.J. Dong, Q. Wang, X.J. Jiang, S.H. Zhan // Hepatology. – 2011. – Vol. 53 (3). – P. 726–736.
9. Poynard T. Biomarkers of liver injury for hepatitis clinical trials: a meta-analysis of longitudinal studies / T. Poynard, Y. Ngo, M. Munteanu, D. Thabut, J. Massard, J. Moussalli, A. Varaud, Y. Benhamou, V. Ratzu // Antivir. Ther. – 2010. – Vol. 15 (4). – P. 617-631.
10. Rockey D.C. Noninvasive measures of liver fibrosis / D.C. Rockey, D.M. Bissell // Hepatology. — 2006. — Vol. 43. — P. 113-120.

11. Szymczak A. Safety and effectiveness of blind percutaneous liver biopsy: analysis of 1412 procedures / A. Szymczak, K. Simon, M. Ingot, A. Gladysz // *Hepat. Mon.* – 2012. - Vol. 12 (1). – P. 32–37.
12. Tsochatzis E.A. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy / E.A. Tsochatzis, K.S. Gurusamy, S. Ntaoula, E. Cholongitas, B.R. Davidson, A.K. Burroughs // *J. Hepatol.* – 2011. – Vol. 54 (4). – P. 650–659.