

БУЛАТОВА ИРИНА АНАТОЛЬЕВНА

**ФИБРОЗ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПЕЧЕНИ:
МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ, КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ
ОЦЕНКА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ И МОНИТОРИНГ
ТЕРАПИИ**

14.01.04 – внутренние болезни

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Пермь – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Щёкотов Владимир Валерьевич

доктор медицинских наук, доцент

Щёктова Алевтина Павловна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
кафедры медико-социальной экспертизы,
неотложной и поликлинической терапии
Института профессионального образования
ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Минздрава России

Буеверов Алексей Олегович

Заслуженный деятель науки Республики Татарстан
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой терапии
ГБОУ ДПО «Казанская государственная
медицинская академия»
Минздрава России

Сайфутдинов Рафик Галимзянович

доктор медицинских наук, профессор,
заместитель директора по клинической работе
ФБУН «Федеральный научный центр
медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения»

Устинова Ольга Юрьевна

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «30» июня 2016 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.067.03 при ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России по адресу: 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России и на сайте www.pdma.ru, с авторефератом на сайтах www.pdma.ru, www.vak.ed.gov.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Малютина Наталья Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Во многих развитых странах заболевания печени входят в первую пятерку причин смертности. В мире насчитывается более 2 млрд. человек с хроническими заболеваниями печени (ХЗП), как вирусной, так и невирусной этиологии (Информационный бюллетень ВОЗ №164, 2013). Основными этиологическими факторами в структуре патологии печени являются инфекции вирусами гепатита и злоупотребление алкоголем. По мнению экспертов ВОЗ гепатит С – одно из трех наиболее социально значимых инфекционных заболеваний. По разным данным HCV в мире инфицировано до 170 миллионов человек (M. Albeldawi et al., 2010; EASL Clinical Practice Guidelines, 2011; P. Deltenre et al., 2015). Доля алкоголя в этиологической структуре циррозов печени (ЦП) в России составляет до 45% (А.И. Хазанов и соавт., 2007; А.И. Павлов и соавт., 2010). Цирроз развивается у 5–18% пациентов вследствие длительного течения алкогольной болезни печени (А.И. Павлов, 2013).

Основной путь прогрессирования ХЗП, приводящий к ее повреждению – это процесс активации фиброгенеза (В.Т. Ивашкин и соавт., 2011; С.Н. Мехтиев и соавт., 2014; A. Wynn, 2008). В последнее время расширились представления о механизмах фиброгенеза, что привело к пониманию обратимости фиброза и к достаточно реалистичным ожиданиям того, что эффективная терапия обеспечит благоприятный прогноз даже при тяжелых стадиях фиброза (E.L. Ellis et al., 2012; J. Fallowfield et al., 2011). В связи с этим, комплексное изучение механизмов развития фиброза печени (ФП) остается актуальной задачей современной медицины.

Сегодня широко изучаются возможности неинвазивной оценки и мониторинга ФП. Разработано много инструментальных методик, лабораторных тестов, индексов и панелей для определения выраженности ФП, которые уменьшили потребность в биопсии у 50-70% пациентов с поражением печени (Е.В. Винницкая и соавт., 2013; Ч.С. Павлов, 2009; И.Ю. Пирогова, 2012; И.Н. Широких, 2014; L. Schiavon et al., 2014; T. Liu et al.,

2012; T. Poynard et al., 2013). Однако, большинство существующих панелей и формул для диагностики ФП запатентованы, сложны и поэтому мало используются в практическом здравоохранении РФ. Таким образом, проведение дополнительных исследований в этой области позволит разработать новые, возможно, более эффективные, а главное - общедоступные тесты диагностики ФП.

Остаются дискуссионными факторы, определяющие темпы прогрессирования фиброза и формирование ЦП. Из факторов, ассоциированных с этиологическими особенностями, наиболее изученными являются: генотип вируса и его репликативная активность, коинфицирование, длительность воздействия этиологического фактора, злоупотребление алкоголем, прием наркотиков. К предикторам ФП, связанными с организмом пациента, относят: мужской пол, пожилой возраст, генетические факторы, ожирение, сахарный диабет, инсулинорезистентность и синдром перегрузки железом (В.Т. Ивашкин и соавт., 2011; Л.И. Краснова и соавт., 2014; С.Н. Мехтиев и соавт., 2014; A. Wynn, 2008). Актуальным является поиск взаимосвязей между однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП) генов-кандидатов и темпами развития ФП. В ряде исследований приводятся противоречивые результаты, что, вероятно, связано с разными критериями включения больных в группы сравнения и этнической неоднородностью групп (С.М. Абдуллаев, 2008; А.В. Колотвин, 2014; Ч.С. Павлов, 2009; О.В. Таратина, 2014; S. Barrett et al., 2003; K. Promrat et al., 2003).

Все вышеизложенное позволяет считать актуальным и современным комплексное изучение механизмов развития фиброза, поиск эффективных и общедоступных тестов диагностики его выраженности, предикторов прогрессирования и оценка риска развития цирроза при заболеваниях печени вирусного и алкогольного генеза.

Цель исследования: сформировать комплекс инструментальных, лабораторных и генетических показателей основных механизмов фиброгенеза печеночной ткани, установить их диагностическую ценность и прогностическую значимость при хронических заболеваниях печени.

Задачи исследования

1. Обозначить комплекс лабораторных параметров, отражающий основные механизмы фиброгенеза при хронических заболеваниях печени.

2. Исследовать корреляционные взаимосвязи между инструментальными и лабораторными характеристиками выраженности фиброза при хронических заболеваниях печени.

3. Установить лабораторные маркеры, имеющие диагностическое значение для дифференциации стадий фиброза печени.

4. Обосновать прогностическую ценность выявленных лабораторных маркеров для определения темпов прогрессирования фиброза и перехода в цирроз печени.

5. Изучить частоту встречаемости аллельных пар по полиморфным локусам генов гиалуроновой кислоты (G/A), каталазы (G262A), глутатион-пероксидазы (C718T), аполиipoproteина-B (R3500Q), интерлейкина-28B (C/T), интерлейкина-17 (C11139G) и васкулоэндотелиального фактора роста (G-634C) у пациентов с хроническим гепатитом и в когорте здоровых лиц Пермского края.

6. Исследовать комбинации аллельных вариантов исследуемых генов в зависимости от тяжести поражения печени и темпа развития фиброза и выявить аллели риска, ассоциированные с прогрессирующим типом течения гепатита.

7. Оценить влияние терапии интерферонами короткого и пролонгированного действия на обратное развитие фиброза при хроническом гепатите.

Научная новизна исследования

Новизна исследования определяется комплексной клинико-инструментальной и лабораторно-генетической характеристикой выраженности и темпов развития фиброза при хронических заболеваниях печени вирусного и алкогольного генеза.

При комплексном исследовании проанализированы и сопоставлены особенности лабораторных маркеров, отражающих основные механизмы фиброгенеза при хронических заболеваниях печени, и выделены наиболее значимые для характеристики стадийности фиброза и перехода его в цирроз.

Выявлены значимые ассоциации степени плотности печени по данным ультразвуковой эластографии и величиной лабораторных параметров: гиалуроновой кислоты, альфа-фетопротейна, альбумина, тромбоцитов, ферритина и провоспалительных цитокинов.

Впервые разработан с применением метода множественной регрессии математический модуль для оценки стадии фиброза, построенный на основе непрямых лабораторных маркеров фиброза при хроническом гепатите (приоритетная справка на заявку заявка № 2015-121-005 от 20.06.2015г.). Установлено, что стратификация стадий фиброза возможна по пороговым значениям гиалуроновой кислоты, альбумина, фактора некроза опухоли-альфа и тромбоцитов.

На основании комплексного обследования пациентов с хроническим гепатитом оценены темпы прогрессирования заболевания (скорость развития фиброза) и определена совокупность лабораторных показателей, взаимосвязанных с прогрессией фиброза печени. Доказано, что прогрессирование фиброза связано с активацией процессов неоангиогенеза, сосудистого ремоделирования, нарастанием уровня ферритина, обменными нарушениями и истощением механизмов антиоксидантной защиты.

Выявлено, что для прогнозирования скорости развития фиброза печени хорошей предикторной ценностью обладают уровень гиалуроновой кислоты, альфа-фетопротейн и концентрация глюкозы.

Доказана высокая предикторная ценность маркеров фиброза и воспаления: гиалуроновой кислоты, альфа-фетопротейна, интерлейкина-6 и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора для прогнозирования риска цирроза печени в исходе хронического вирусного гепатита.

Впервые установлено, что носительство аллеля С гена васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA* (G-634C) в виде гомозиготы CC является фактором риска хронизации гепатита С.

Впервые установлено, что полиморфизмы генов каталазы *CAT* (G262A), глутатион-пероксидазы *GPX4* (C718T), *IL28B* (C/T) и васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA* (G-634C) определяют индивидуальные особенности поражения печени. Установлены аллели риска, ассоциированные с прогрессирующим типом течения хронического гепатита С – аллель гена *CAT* +262A, гена *GPX4* +718T, аллель T гена *IL28B* и аллель -634C гена *VEGFA* и определяющие медленное течение заболевания – генотип гена *CAT* +262 GG, гена *GPX4* +718 CC, генотип CC гена *IL28B* и -634 GG гена *VEGFA*.

Проведена оценка возможности обратного развития фиброза, как мишени для терапевтического воздействия при хроническом гепатите. Выявлено, что терапия интерферонами короткого и пролонгированного действия сопровождается уменьшением выраженности фиброза за счет снижения холестаза, воспаления, процессов сосудистой перестройки и пероксидации липидов при нормализации механизмов антиоксидантной защиты, что приводит к снижению скорости его развития. Положительная динамика лабораторных маркеров (гиалуроновой кислоты, альфа-фетопротейна, гамма-глутамилтранспептидазы, цитокинов, малонового диальдегида, антиоксидантных ферментов) отражает обратное развитие фиброза печени при интерферонотерапии хронического гепатита препаратами короткого и пролонгированного действия.

Сформулирована концепция влияния патогенетических и генетических механизмов на скорость развития фиброза. Установлено, что развитие и

прогрессирование фиброза при хронических заболеваниях печени, как вирусного, так и алкогольного генеза связано с активацией механизмов неангиогенеза, сосудистого ремоделирования, нарушением обмена железа, снижением уровня глюкозы и истощением антиоксидантной защиты, выраженность которых маркирует не только степень поражения гепатоцитов, но и темпы развития фиброза, предопределяя его исход в цирроз печени.

Практическая значимость работы

Разработана модель диагностического лабораторного алгоритма для комплексного обследования пациентов с хроническими заболеваниями печени, позволяющего оценить выраженность, темпы и генетический риск прогрессирования фиброза, прогнозировать развитие цирроза и оценить антифибротическую эффективность терапии.

Показано, что применение расчетных пороговых значений гиалуроновой кислоты и индекса фиброза с использованием значений альбумина, фактора некроза опухоли-альфа и тромбоцитов позволяет дифференцировать стадии фиброза печени.

Прогнозирование скорости развития фиброза при хроническом гепатите определяется увеличением уровней гиалуроновой кислоты, альфа-фетопротейна и уменьшением концентрации глюкозы.

Определены лабораторные маркеры и рассчитаны их пороговые значения (гиалуроновая кислота, альфа-фетопротейн, интерлейкин-6 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) для прогноза риска развития цирроза печени.

Выявление однонуклеотидных полиморфизмов генов *CAT* (G262A), *GPX4* (C718T), *IL28B* (C/T) и *VEGFA* (G-634C) у больных хроническим гепатитом указывает на риск прогрессирования фиброза печени.

В качестве лабораторного критерия оценки антифибротического эффекта терапии хронического гепатита препаратами интерферона короткого и пролонгированного действия предложен комплекс следующих показателей: гиалуроновая кислота, гамма-глутамилтранспептидаза, альфа-фетопротейн,

фактор некроза опухоли-альфа, интерлейкин-6, васкулоэндотелиальный фактор роста, малоновый диальдегид, каталаза и глутатион-пероксидаза. Положительная динамика данных параметров свидетельствует об обратном развитии фиброза.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комплекс основных показателей, отражающих процессы активации перекисного окисления липидов, истощения механизмов антиоксидантной защиты, гиперпродукции провоспалительных цитокинов, нарушения обмена железа, усиления процессов регенерации и неоангиогенеза в печени маркируют выраженность фиброза и его прогрессирование при хронических заболеваниях печени.

2. Предложены лабораторные модули для стратификации стадий фиброза на основании пороговых значений гиалуриновой кислоты и индекса фиброза.

3. Прогноз темпов прогрессирования фиброза и перехода его в цирроз печени основан на изменении ряда показателей предлагаемого лабораторного комплекса (гиалуриновая кислота, альфа-фетопроtein, глюкоза, интерлейкин-6 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор).

4. Индивидуальные особенности прогрессирования фиброза печени определяются полиморфизмом генов каталазы *CAT* (G262A), глутатион-пероксидазы *GPX4* (C718T), интерлейкина *IL28B* (C/T) и васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA* (G-634C).

5. Положительная динамика инструментально-лабораторных маркеров фиброза отражает его обратное развитие при интерферонотерапии хронического гепатита препаратами короткого и пролонгированного действия.

Внедрение результатов исследования

Теоретические положения и практические результаты диссертационного исследования применяются в учебном процессе кафедр внутренних болезней и поликлинической терапии, факультетской терапии №

2 и профессиональных болезней с курсом профболезней ДПО, инфекционных болезней и клинической лабораторной диагностики факультета ДПО ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, в учебном процессе на кафедре лабораторной диагностики Института последипломного образования ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедры факультетской терапии ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» Минздрава России.

Результаты исследования внедрены в работу лабораторных подразделений ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», лечебно-диагностического процесса ФГБУ «3 Центральный военный клинический госпиталь им. А.А. Вишневского» Минобороны России, ГБУЗ ПК «Клиническая медико-санитарная часть №1», ГБУЗ ПК «Пермская краевая клиническая инфекционная больница», ООО «Центр профессиональной медицины», ООО «Профессорская клиника».

Соответствие паспорту научной специальности

Областью исследования является изучение патогенеза заболеваний внутренних органов желудочно-кишечного тракта: хронического гепатита и цирроза печени, их клинических и патофизиологических проявлений с использованием клинических, лабораторных, иммунологических, генетических, патоморфологических, биохимических и инструментальных методов исследований, совершенствование лабораторных и инструментальных методов обследования больных, совершенствование дифференциальной диагностики, изучение механизмов действия и эффективности лекарственных препаратов (содержание пунктов 2, 3, 4 из Паспорта специальности). Указанная область и способы исследования соответствуют специальности 14.01.04 – внутренние болезни.

Связь диссертационной работы с научными программами

Тема диссертации утверждена решением ученого совета ГБОУ ВПО ПГМА им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, протокол № 4 от 16.04.2014 г. Диссертационная работа выполнялась в рамках комплексной темы НИР ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (номер государственной регистрации темы 11503010059). Ее результаты вошли в отчеты по НИР ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России.

Личный вклад автора в исследование

Личный вклад автора заключался в непосредственном участии во всех этапах диссертационного исследования: в планировании, организации и проведении исследований по всем разделам работы, генерации идеи, углубленном анализе научной литературы, разработке дизайна и программы клинико-лабораторно-инструментальных исследований, формировании цели и задач исследования. Автор лично участвовала в наборе клинического материала: клиническое обследование больных, организовывала преаналитический этап и контролировала забор биоматериала. Автором лично проводилось обобщение и анализ полученных клинических и лабораторно-инструментальных результатов исследования, разработана модель патогенетических механизмов развития и прогрессии фиброза и модель лабораторного алгоритма, позволяющего оценить выраженность, темпы и генетический риск прогрессирования фиброза, прогнозировать развитие цирроза и оценить антифибротическую эффективность терапии. Вся полученная информация статистически обработана и систематизирована лично автором.

Апробация работы

Выводы и результаты исследования доложены на Тринадцатой Российской конференции «Гепатология сегодня» (Москва, 2008), Всероссийской гастроэнтерологической конференции (Москва, 2009), научной сессии ПГМА (Пермь, 2013), международной конференции в Баку

(Азербайджан, 2013), 12-м Европейском конгрессе по внутренней медицине в Праге (Чехия, 2013), краевой научно-практической конференции Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики «Инновационные технологии лабораторного анализа и новые возможности их клинического применения» (Пермь, 2014), краевой научно-практической конференции «Диагностическая значимость лабораторных тестов в практической медицине» (Пермь, 2014), научной сессии молодых ученых ПГМА им. Е.А. Вагнера «Навстречу 100-летию высшего медицинского образования на Урале» (Пермь, 2014), 13-м Европейском конгрессе по внутренней медицине в Женеве (Швейцария, 2014), Пражских европейских днях по внутренней медицине (Чехия, 2014), XX Российской гастроэнтерологической неделе (Москва, 2014), XIX российском конгрессе «Гепатология сегодня» (Москва, 2014), научной сессии ПГМА им. Е.А. Вагнера на секции «Актуальные вопросы лабораторной диагностики» (Пермь, 2015), краевой научно-практической конференции «Лабораторная диагностика – возможности теории и практики» (Пермь, 2015), X Национальном конгрессе терапевтов (Москва, 2015), XIX Международной научной конференции «Здоровье нации – XXI век» (Светлогорск, 2015).

Апробация проведена на расширенном заседании кафедры госпитальной терапии, кафедры внутренних болезней и поликлинической терапии, кафедры факультетской терапии № 2 и профессиональных болезней с курсом профболезней ДПО, кафедры эндокринологии и клинической фармакологии, кафедры клинической лабораторной диагностики факультета ДПО, кафедры инфекционных болезней, кафедры патологической анатомии с секционным курсом, кафедры патологической физиологии, сотрудников ЦНИЛ ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России и представителей ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, протокол № 5/2 от от «05» февраля 2016 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 34 печатные работы, из них 18 – в рекомендуемых ВАК изданиях. Получены 2 приоритетные справки на изобретение: «Способ диагностики стадии фиброза печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С» заявка № 2015-121-005 от 20.06.2015г. и «Способ диагностики стадии фиброза печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С» заявка № 2015-139-205 от 14.09.2015г.

Опубликована 1 монография в соавторстве «Эндотелиальная дисфункция и фиброз печени» (2012 г.) и 2 методические рекомендации, утвержденные ЦКМС ГБОУ ВПО ««Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России (протокол № 9 от 2 декабря 2015 г.) и Министерством здравоохранения Пермского края от 25.01.2016г. в качестве внедрения результатов диссертации в учебный и лечебно-диагностический процессы.

Структура и объем работы

Диссертация представляет собой рукопись на русском языке объемом 253 страницы машинописного текста, состоит из введения, семи глав, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 368 источников, из которых 128 отечественных и 240 зарубежных. Работа иллюстрирована 52 таблицами, 53 рисунками и 5 клиническими примерами.

Диссертация выполнена на кафедре клинической лабораторной диагностики ФДПО (зав. кафедрой – д.м.н., доцент А.П. Щёктова) ГБОУ ВПО ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России (ректор – заслуженный деятель науки, профессор И.П. Корюкина).

Исследование было проведено в соответствии с Хельсинской декларацией (Хельсинки, Финляндия 1964 г.) и одобрено Этическим комитетом ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера (Пермь, 2013 г.) на проведение научного исследования с участием человека. От каждого пациента получено информированное согласие на участие в исследовании.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Основную группу наблюдения составили 170 пациентов с ХЗП: 150 больных хроническим гепатитом С (ХГС) и 20 пациентов с алкогольной болезнью печени – вариант алкогольного цирроза печени (АЦП) в фазе субкомпенсации (В класс по Чайлд-Пью). Контрольная группа состояла из 100 практически здоровых лиц средним возрастом $37,29 \pm 10,14$ лет (от 18 до 55 лет), 58 женщин и 42 мужчины, у которых в анамнезе, при клиническом и лабораторном обследовании не было обнаружено патологии печени. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Характеристика групп пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика групп исследуемых больных

Характеристика	ХГ (n=150)	АЦП (n=20)
Возраст, лет ($M \pm \sigma$)	$38,89 \pm 11,31$	$49,5 \pm 10,8$
min-max, лет	18 - 65	34 - 66
Мужчины, n (%)	74 (49%)	14 (70%)
Женщины, n (%)	76 (51%)	6 (30%)
Длительность заболевания, лет ($M \pm \sigma$)	$5,96 \pm 3,49$	$11,9 \pm 6,2$

Клиническое обследование пациентов с ХЗП включало анализ первичной медицинской документации, опрос и осмотр по традиционной схеме с детализацией жалоб гепатологического характера. Клинический диагноз ХГС и АЦП устанавливался в соответствии рекомендациями европейской и российской ассоциации по изучению печени (EASL Clinical practice guidelines, 2011; В.Т. Ивашкин и соав., 2013). Для уточнения этиологии процесса были оценены факторы риска гепатотоксичности, исключено лекарственное, жировое, аутоиммунное, опухолевое поражение печени и болезни накопления.

Пациентам проводилось лабораторное обследование, включавшее

стандартные общеклинические тесты, биохимические показатели: аланинаминотрансферазу (АЛТ), аспартатаминотрансферазу (АСТ), гамма-глутамилтранспептидазу (ГГТП), щелочную фосфатазу (ЩФ), фракции билирубина, общий белок, альбумин, тимоловую пробу, определение маркеров вирусных гепатитов методом иммуноферментного анализа (ИФА), индикация HCV-РНК, генотипа вируса и уровня вирусной нагрузки методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Алкогольный генез ЦП подтверждался на основании критериев хронической алкогольной интоксикации: данных анамнеза (указание на систематический прием алкоголя в гепатотоксических дозах: более 20 мл этанола в сутки для женщин и более 30 мл в сутки для мужчин), результатов тестирования по опроснику GAGE, косвенным объективным и лабораторным признакам хронической алкогольной интоксикации (А.И. Павлов, 2013; A. Topic et al., 2013).

Наряду с общеклиническими исследованиями для достижения поставленных задач мы применяли *специально разработанный диагностический лабораторный комплекс*, включающий в себя оценку следующих показателей в крови: определение прямого маркера фиброза гиалуроновой кислоты (ГК) методом ИФА; исследование маркера регенерации гепатоцитов альфа-фетопротеина (АФП) методом иммунохемилюминисцентного анализа; определение активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) по уровню малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой фотометрически методом в модификации Ю.В. Владимирова и А.В. Арчакова (1972); оценка активности антиоксидантных ферментов каталазы по методу Королюк М.А. (1988) и глутатион-пероксидазы (ГЛП) по методу Prohaska J.R. (1986); исследование показателей обмена железа – сывороточного железа, общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС) и концентрации ферритина; определение сывороточных уровней васкулоэндотелиального фактора роста (ВЭФР), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

(Г-КСФ), провоспалительных цитокинов - фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-17 методом ИФА; исследование метаболических показателей - липидного спектра, концентрации глюкозы, С-пептида, лептина и инсулина, а также расчет индекса резистентности к инсулину (индекс НОМА-IR) по формуле: $\text{НОМА-IR} = \text{глюкоза натощак (ммоль/л)} \times \text{инсулин натощак (мкЕд/мл)} / 22,5$; определение ОНП генов гиалуроновой кислоты *HAS1* (G/A), каталазы *CAT* (G262A), глутатион-пероксидазы *GPX4* (C718T), васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA* (G-634C), интерлейкина-28В *IL28B* (C/T) и интерлейкина-17 *IL17F* (C11139G) и аполипопротеина-В *ApoB* (R3500Q) в когортах больных ХГС и здоровых лиц с использованием аллель-специфической ПЦР "SNP-Скрин" с детекцией продуктов в режиме реального времени.

В качестве референсного метода оценки выраженности фиброза у больных ХГС была использована ультразвуковая эластография печени (УЗЭ) печени с оценкой плотности печени по шкале «METAVIR» с помощью аппарата Fibroscan 502 (Echosens, Франция). У 20 пациентов была проведена лапароскопическая биопсия печени. Заключение патоморфолога позволяло установить более точный морфологический диагноз в спорных случаях, когда у больных были пограничные уровни значения плотности печени при УЗЭ. При этом, помимо стандартного описания гистологической картины оценивался индекс фиброза по шкале «METAVIR». Состояние портального кровотока у пациентов с ХЗП оценивалось методом УЗИ.

У 110 больных ХГС была рассчитана скорость развития фиброза (СРФ), как соотношение стадии фиброза (в баллах) к длительности инфицирования (в годах). Данный показатель является количественным отражением темпов прогрессирования ХГ (Т. Роупард, 1997).

Программа лечения. В первой группе больных ХГС (n=20) основным препаратом был пролонгированный интерферон «ПегИнтрон» (Пег-ИФН- α -2b) (Schering-Plough Ltd. США) в виде п/к инъекций в дозе 1-1,5 мкг/кг 1 раз в

неделю. Во второй группе пациенты (n=30) получали отечественный интерферон короткого действия «Альтевир» (интерферон альфа-2b) (ОАО «Фармстандарт», Россия) внутримышечно через день по 3 млн. Ед. В качестве комбинированного препарата больные обеих групп получали отечественный противовирусный препарат «Рибавирин» («Фармстандарт», Россия) внутрь в соответствии с инструкцией. Длительность терапии составляла в обеих группах 24 недели при генотипах HCV-2 и HCV-3 и 48 недель - при генотипе HCV-1. На момент окончания лечения оценивали динамику СРФ, лабораторные и инструментальные маркеры фиброза, медиаторы воспалительного процесса, уровень МДА и антиоксидантные ферменты, клинические и биохимические параметры, вирусологический ответ. Дизайн исследования представлен двумя этапами: диагностическим и терапевтическим (рис. 1).



Рис. 1. Дизайн исследования

Статистическая обработка материала. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью компьютерных программ «STATISTICA 6.0», встроенного пакета анализа табличного процессора «Microsoft Excel 2010», а также авторского пакета прикладных электронных

таблиц «Stat-2000» (В.С. Шелудько, 2001). Для изучения характера распределения данных применялся критерий Колмогорова-Смирнова. Данные описывались с помощью среднего и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) и в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-ый и 75-ый процентиля). Корреляционный анализ проводился с вычисление коэффициентов линейной корреляции Пирсона и ранговой корреляции Спирмена. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Для вычисления уравнения, позволяющего рассчитать прогнозируемое значение плотности печени по лабораторным и показателям использовался метод множественной регрессии. Для расчета пороговых значений и диагностической эффективности показателей, имеющих предикторную ценность проводился ROC-анализ и расчет отношения шансов (QR). Оценка адекватности прогноза проводилась по четырехпольной таблице с расчетом показателей чувствительности и специфичности, воспроизводимости и соответствия (В.В. Власов, 1988). Для описания соотношения частот генотипов и аллелей изучаемых генов использовали равновесие Харди-Вайнберга. Для частотного анализа использовался метод χ^2 . Различия в двух популяциях рассчитывались по отношению шансов (OR) с использованием подхода "случай-контроль" для различных моделей наследования: аддитивной, общей, мультипликативной, доминантной и рецессивной и считались достоверными при $p < 0,05$. Определение зависимости между изучаемыми качественными признаками проводилось по таблице сопряженности (кросстабуляции) (В.С. Шелудько, 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-лабораторная характеристика стадий фиброза и диагностическая ценность его маркеров при хронических заболеваниях печени. Как было сказано выше, в качестве референсного метода оценки стадии ФП у больных ХГ была использована УЗЭ на аппарате Fibrosan 502 (Echosens, Франция). Подгруппу без фиброза F0 с нормальной плотностью печени составили 57 (38%) человек. Фиброз первой степени (F1) выявлен у

35 (23%) больных. Вторая стадия (F2) диагностирована у 25 (17%) участников исследования, третья стадия (F3) – у 10 (7%) пациентов, 23 (15%) больных имели фиброз (F4), что соответствовало доклинической стадии ЦП в исходе ХГ (рис. 2). В среднем в группе больных ХГ по данным УЗЭ плотность печени составила 6,8 (5,5; 8,9) кПа. У мужчин наблюдались более выраженные стадии ФП в сравнении с женщинами ($p=0,03$).

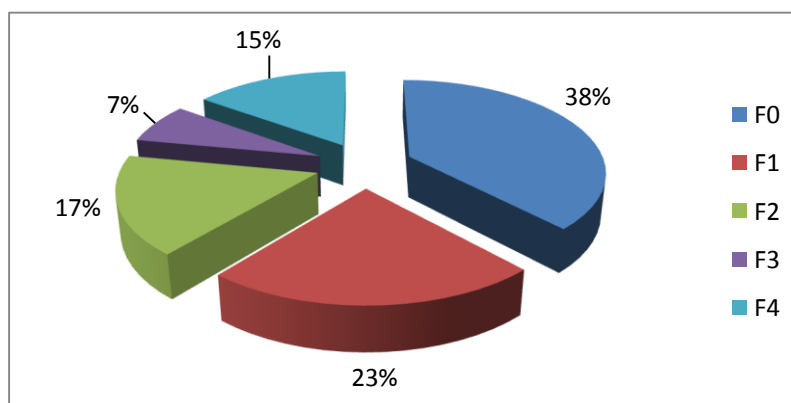


Рис. 2. Распределение пациентов с ХГ по стадиям фиброза.

У больных АЦП методом УЗИ были выявлены признаки портальной гипертензии в виде расширения сосудов портальной системы, спленомегалии, асцита, диффузно-неравномерного повышения эхогенности печени. Характеристика группы больных ХГ по клиническим данным с учетом стадии ФП и пациентов с АЦП представлена в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика группы больных ХГ по клиническим данным в зависимости от стадии фиброза и пациентов с АЦП

Клинические синдромы	F0 (n=57)	F1-2 (n=60)	F3 (n=10)	F4 (n=23)	АЦП (n=20)
Мужчины (n,%)	27 (45%)	26 (43%)	7 (70%)	14 (61%)	14 (70%)
Женщины (n,%)	30 (55%)	34 (57%)	3 (30%)	9 (39%)	6 (30%)
Клинические синдромы					
Астенический (n,%)	3 (5%)	16 (27%)	8 (80%)	23(100%)	20(100%)
Диспепсический (n,%)	2 (3,5%)	9 (15%)	4 (40%)	13 (56%)	20(100%)
Болевой (n,%)	3 (5%)	7 (12%)	3 (30%)	5 (22%)	2 (10%)
Желтуха (n,%)	0	2 (3%)	3 (30%)	10 (43%)	16 (80%)
Геморрагический (n,%)	0	0	0	11 (48%)	12 (60%)
Портальная	0	0	0	6 (26%)	20(100%)

гипертензия (n,%)					
-------------------	--	--	--	--	--

Клиническая симптоматика у больных ХГ в целом нарастала с увеличением стадии фиброза, однако была достаточно вариабельна. Если при легком фиброзе доминировали субъективные жалобы и клинические признаки активности заболевания, то при ЦП в исходе ХГ у 26% больных отмечались явления портальной гипертензии по данным УЗИ. Из клинических симптомов наиболее часто присутствовал астенический синдром. У 80% пациентов была обнаружена умеренная гепатомегалия.

У пациентов с АЦП астенический синдром был выявлен в 100% случаев. Больше половины больных отмечали снижение веса и зуд кожных покровов. При объективном осмотре у 80% лиц данной группы было зарегистрировано увеличение и уплотнение печени разной степени выраженности, печеночные «знаки» в виде телеангиэктазий и клинические признаки портальной гипертензии, в 60% случаев выявлено увеличение селезенки.

Уровень ГК в сыворотке крови пациентов с ХГ составил в среднем 35,4 (19,3; 61,1) нг/мл, АФП - 2,3 (1,59; 3,5) МЕ/мл, что было значимо выше, чем в группе контроля (p=0,01 и p=0,02, соответственно). Определение ГК позволяло стратифицировать все стадии ФП при ХГ (рис. 3), а оценка маркера регенерации гепатоцитов АФП – дифференцировать выраженный фиброз от умеренного, а также верифицировать ЦП в исходе ХГ (рис. 4).

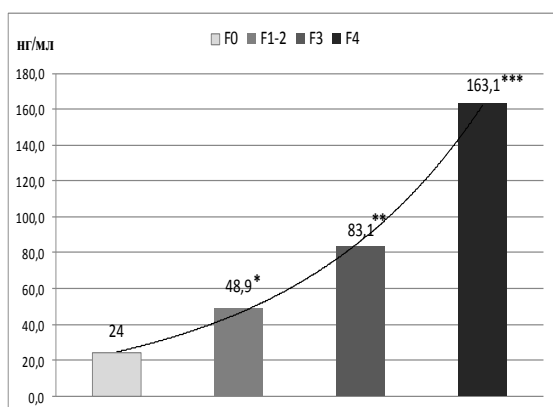


Рис. 3. Значения ГК у больных ХГ в зависимости от стадии ФП.

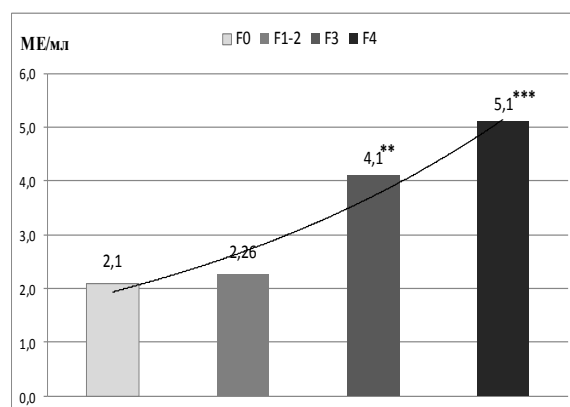


Рис. 4. Значения АФП у больных ХГ в зависимости от стадии ФП.

Примечание: *-различия достоверны при стадии F1-2 в сравнении с F0; **-различия достоверны при F3 в сравнении с F1-2; ***-различия достоверны при F4 в сравнении с F3.

Найдены достоверные взаимосвязи ГК и АФП с плотностью печени ($r=0,79$; $p<0,001$ и $r=0,53$; $p<0,001$, соответственно), а также прямая корреляция ГК и АФП ($r=0,3$; $p=0,03$).

У больных АЦП медиана концентрации ГК в крови составляла 410,6 (172; 781) нг/мл, что в 2,5 раза превышала уровень этого показателя при ЦП в исходе ХГ ($p=0,001$), а маркер регенерации АФП не имел достоверных отличий и равнялся 5,5 (2,8; 7,7) ($p=0,13$). Значения ГК при АЦП также демонстрировали взаимосвязь с АФП ($r=0,41$; $p=0,03$).

Таким образом, прогрессирование процессов фиброза при ХЗП вирусной и алкогольной этиологии происходит на фоне активации репаративных механизмов, что проявляется увеличением сывороточных уровней ГК и АФП, которые отражают степень повреждения ткани печени.

Взаимосвязь биохимических тестов с выраженностью фиброза. По данным биохимических тестов у больных ХГ регистрировались синдромы цитолиза и холестаза, более выраженные у мужчин ($p=0,001$ и $p<0,001$, соответственно). По мере прогрессирования фиброза снижался уровень альбумина и количество тромбоцитов (табл. 3), что подтверждалось наличием их обратных корреляций с плотностью печени ($r=-0,79$; $p<0,001$ и $r=-0,78$; $p<0,001$, соответственно) и обратной взаимосвязью числа тромбоцитов с ГК ($r=-0,55$; $p=0,001$). У пациентов со стадией F4 зарегистрированы достоверно более повышенные значения гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) в сравнении с фиброзом стадии F3 ($p=0,01$) (табл. 3), коррелирующие с ГК ($r=0,45$; $p=0,03$) и АФП ($r=0,39$; $p=0,03$).

В группе пациентов с АЦП изучаемые биохимические тесты были значимо изменены, отражая наличие холестаза, нарушения белково-синтетической функции печени, мезенхимального воспаления и печеночно-клеточной недостаточности. При этом, изменения функциональных тестов были значимо выраженнее, чем в подгруппе больных ЦП в исходе ХГ (табл. 3), а ГК прямо коррелировала с ГГТП ($r=0,53$; $p=0,01$) и обратно – с альбумином ($r=-0,51$; $p=0,01$) и тромбоцитами ($r=-0,56$; $p=0,001$).

Значения исследуемых тестов в зависимости от стадии фиброза у пациентов с ХГ и в группе с АЦП, Ме (25; 75)

Пок-ли	F0 (n=57)	F1-2 (n=60)	F3 (n=10)	F4 (n=23)	АЦП (n=20)
ГГТП, Е/л	27,5 (20; 60,5)	26,3 (17; 42,5)	24,0 (17; 34,7)	65,0 (51; 103) ³	175,7 (77,5; 300) ⁴
Альбумин, г/л	49,8 (48; 49,3)	47,5 (46; 47,1) ¹	39,8 (38; 43) ²	38,5 (36,8; 42,7)	32,6 (28,5; 35,1) ⁴
Тромбоц., *10 ⁹ /л	304,0 (246; 312)	240,0 (196; 300) ¹	166,0 (135; 199) ²	162,0 (134; 192)	113,5 (84; 139) ⁴
МДА, мкмоль/л	8,6 (5,7; 12,5)	7,5 (4,6; 10,5)	6,8 (2,5; 11,2)	10,1 (6,1; 11,5) ³	15,1 (13; 15,7) ⁴
Ферритин, нг/мл	41,3 (29; 164)	82,7 (42; 235) ¹	85,6 (28; 462)	233 (182; 235) ³	325,8 (209; 401) ⁴
ВЭФР, пг/мл	367,7 (161; 432)	447,0 (276;653) ¹	643,0 (559;727) ²	570,0 (527;689)	519,9 (429;645)
Г-КСФ, пг/мл	6,0 (4,4;12,8)	6,95 (4,8;16,2)	14,5 (12;14,8) ²	17,8 (13;26,5) ³	16,2 (9,9; 39,1)
ФНО α , пг/мл	1,5 (1; 2)	2,5 (1,5; 3) ¹	7,8 (3,8;11,5) ²	8,6 (4;19,7)	6,5 (3,2; 9,1)
ИЛ-6, пг/мл	0 (0; 0,9)	0,7 (0; 2) ¹	2,3 (0; 4,6)	22,0 (3; 64,1) ³	29,6 (23; 93,8) ⁴
Глюкоза, ммоль/л	5,36 (4,7; 6,1)	4,69 (3,4; 5,3) ¹	5,1 (5; 5,4)	4,16 (4,1; 4,5) ³	4,2 (4,12; 4,4) ⁴
ХС, ммоль/л	4,16 (3,9; 4,7)	4,49 (3,9; 4,98)	4,47 (4,2; 4,8)	3,53 (2,8;4,2) ³	3,7 (3,3; 4,2)
Инсулин, мкМЕ/мл	8,1 (5,1;11,2)	7,8 (6,1; 9,2)	7,8 (7,5; 8,1)	13 (8,1;13,3) ³	7,9 (5,9; 8,9) ⁴
С-пептид, нг/мл	3,1 (1,4; 3,7)	3,3 (2,2; 5,05)	2,65 (2,6; 3,6)	5,3 (3,7; 6,2) ³	2,5 (1,1; 3,3) ⁴
Лептин, нг/мл	2,75 (1,5; 6,5)	3,4 (2,2; 5,5)	3,5 (2,3; 5,6)	5,6 (4,3; 10,9) ³	2,8 (1,6; 5,1) ⁴

Примечание: ¹ – различия достоверны в группе с F1-2 в сравнении с F0; ² – различия достоверны в группе с F3 в сравнении с F1 – 2; ³ – различия достоверны в группе с F4 в сравнении с F3; ⁴ – различия достоверны в группе с АЦП в сравнении с F4 при ХГ.

То есть, снижение уровня альбумина и количества тромбоцитов отражают процессы прогрессирования фиброза вплоть до цирроза.

Маркеры перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в зависимости от тяжести поражения печени. У больных ХЗП с различной стадией фиброза и циррозом выявлено увеличение концентрации МДА, что свидетельствует об активации процессов ПОЛ. Уровень МДА при переходе ХГ в цирроз значимо повышался ($p=0,02$). В группе с АЦП выраженность пероксидации липидов по уровню МДА была значимо больше, чем у пациентов с ЦП в исходе ХГ ($p<0,001$) (см. табл. 3). По мере нарастания цитолиза и репликации вируса при ХГ активность каталазы снижалась ($p=0,04$ и $p=0,04$, соответственно).

Таким образом, прогрессирование поражения печени взаимосвязано с усилением процессов пероксидации липидов, более выраженном при алкогольном генезе, при одновременном истощении механизмов антиоксидантной защиты со снижением выработки антиоксидантных ферментов.

Взаимосвязь показателей обмена железа с фиброзом при заболеваниях печени. Показатели сывороточного железа и ОЖСС у пациентов с фиброзом и ЦП достоверно не отличались от группы контроля, хотя у части больных были повышены. Значения ферритина при ХГ возрастали по мере нарастания интенсивности цитолиза ($p=0,04$) и выраженности фиброза, что позволяло дифференцировать F0 от фиброза стадий F1-F2 ($p=0,03$), а фиброз стадий F1-3 от ЦП в исходе ХГ ($p=0,01$) (см. табл. 3). Это подтверждалось наличием прямых взаимосвязей ферритина с АЛТ ($r=0,31$; $p=0,02$) и плотностью печени ($r=0,35$; $p=0,02$). У больных АЦП концентрация ферритина была значимо выше, чем у пациентов с ХГ на стадии F4 ($p=0,01$) (см. табл. 3), а ферритин прямо коррелировал с АФП ($r=0,61$; $p=0,02$), МДА ($r=0,55$; $p=0,03$) и обратно – с активностью каталазы ($r=-0,52$; $p=0,03$) и ГЛП ($r=-0,45$; $p=0,03$). Таким образом, прогрессирование фиброза в цирроз при ХЗП взаимосвязано с нарушением процессов метаболизма железа и повышением концентрации ферритина вследствие

нарушения обменных функций печени и депонировании макрофагами печени железа, более значимом при алкогольном генезе поражения.

Уровни сывороточных цитокинов и факторов роста в зависимости от тяжести фиброза печени. Концентрация факторов роста и провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных ХГ повышалась по мере увеличения выраженности фиброза. Так, уровень ВЭФР у пациентов на стадии F3 был значимо выше, чем при F1-2 ($p=0,01$), а также достоверно различался от больных с отсутствием фиброза ($p=0,03$). Концентрация Г-КСФ в крови больных значимо повышалась на стадии тяжелого фиброза F3 ($p=0,01$) и ЦП в исходе ХГ ($p=0,03$). Провоспалительные цитокины ФНО- α и ИЛ-6 также значимо увеличивались по мере прогрессирования ФП (см. табл. 3). Уровни ВЭФР, Г-КСФ и ФНО- α у лиц с АЦП не имели достоверных отличий от показателей при ЦП в исходе вирусного гепатита ($p=0,33$; $p=0,17$ и $p=0,36$, соответственно). При этом, медиана концентрации ИЛ-6 у лиц с АЦП в 4,5 раза была выше, чем при F4 в исходе ХГ ($p<0,001$) (см. табл. 3).

В группе больных ХГ выявлены прямые корреляции ВЭФР, Г-КСФ, ФНО- α и ИЛ-6 с плотностью печени ($p=0,001$, $p=0,01$, $p<0,001$ и $p=0,001$, соответственно), взаимосвязи ФНО- α и ИЛ-6 с АЛТ ($p=0,02$ и $p=0,004$), ИЛ-6 с ГГТП ($p=0,01$) и ферритином ($p=0,03$). У пациентов с АЦП найдены прямые корреляции ВЭФР, Г-КСФ, ФНО- α и ИЛ-6 с ГК ($p=0,004$, $p=0,03$, $p=0,01$ и $p=0,02$, соответственно). То есть, повышение уровней ВЭФР, Г-КСФ, ФНО- α и ИЛ-6 при ХЗП вирусной и алкогольной этиологии соответствуют тяжести поражения гепатоцитов, а также развитию и прогрессированию фиброзных изменений вплоть до ЦП.

Взаимосвязь метаболических показателей со степенью поражения печени. У 20% пациентов с ХГ был повышен уровень триглицеридов ($p=0,002$), у 36% больных – липопротеинов низкой плотности ($p=0,02$), индекса атерогенности ($p=0,013$), инсулина ($p=0,02$), индекса НОМА-IR ($p=0,02$), в 48% случаев - С-пептида ($p=0,04$), у 13% больных - лептина ($p=0,001$) относительно группы контроля. При ЦП в исходе ХГ

регистрировались значимо низкие концентрации холестерина (ХС) ($p=0,03$) и глюкозы ($p=0,03$), повышенные значения инсулина ($p=0,01$), лептина ($p=0,04$) и уровня С-пептида ($p=0,04$) (см. табл. 3). Метаболические нарушения у пациентов с АЦП проявлялись в виде снижения уровня глюкозы, холестерина и липопротеинов высокой плотности при повышении концентрации триглицеридов.

Таким образом, развитие фиброза при ХЗП, как вирусного, так и алкогольного генеза связано с активацией процессов пероксидации липидов, механизмов сосудистого ремоделирования и неоангиогенеза, нарушением обмена железа, гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, гипогликемией, дислипидемией и истощением антиоксидантной защиты, выраженность которых маркирует степень поражения гепатоцитов.

Взаимосвязь патогенетически значимых тестов с темпом прогрессирования фиброза печени. В нашем исследовании СРФ у больных ХГ в среднем равнялась $0,19 \pm 0,18$ балла/год, нарастала по мере увеличения выраженности ФП от стадии F1 к F2 ($p=0,01$) и от F2 к F3 ($p=0,01$) (рис. 5).

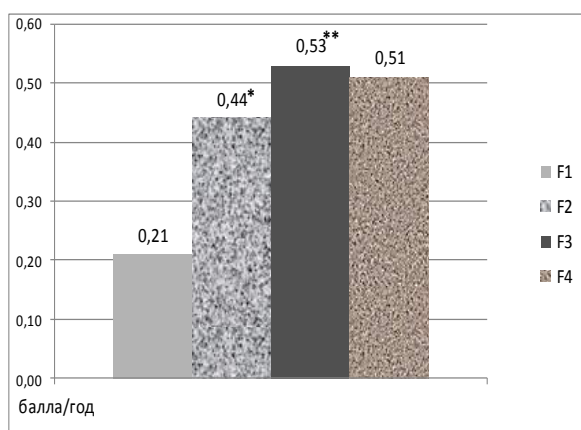


Рис. 5. Скорость развития фиброза в зависимости от его стадий.

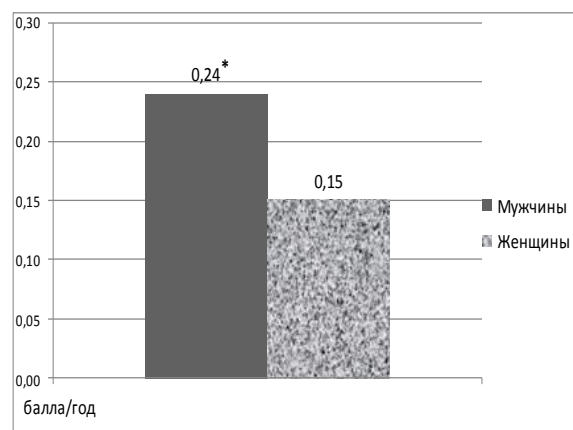


Рис. 6. Скорость развития фиброза у мужчин и женщин с ХГ.

Примечание: *-различия достоверны при F2 от F1; **-различия достоверны при F3 от F2.

При этом, у мужчин этот показатель почти в 2 раза был выше, чем у женщин ($p=0,04$) (рис. 6). Мы выделили быстрый (до 10 лет) и медленный (более 10 лет) темп прогрессирования фиброза. В группе с медленным

темпом прогрессирования заболевания (n=67) преобладали пациенты со стадией F0 (84%), СРФ в среднем равнялась $0,02 \pm 0,02$ балла/год (рис. 7). В группе с быстрой прогрессией заболевания (n=43) половина больных имели тяжелые стадии фиброза (F3-F4), а СРФ в среднем составила $0,45 \pm 0,34$ балла/год ($p < 0,001$) (рис. 8).



Рис. 7. Стадии фиброза в группе с медленной скоростью его развития.

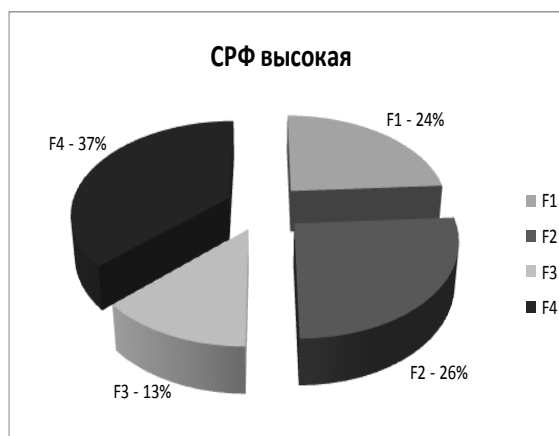


Рис. 8. Стадии фиброза в группе с высокой скоростью его развития.

У больных с высокой СРФ ожидаемо регистрировались достоверно большие значения плотности печени по данным УЗЭ ($p < 0,001$). Сывороточные уровни ГК и АФП при быстром темпе прогрессии ХГ были выше, чем при медленной СРФ ($p < 0,001$ и $p = 0,04$) (табл. 4). Корреляционный анализ подтвердил наличие прямых достоверных взаимосвязей темпа прогрессирования фиброза с плотностью печени ($r = 0,86$; $p < 0,001$), ГК ($r = 0,6$; $p < 0,001$) и АФП ($r = 0,49$; $p = 0,001$). Прогрессирование фиброза при ХГ сопровождается активацией механизмов патологической регенерации печени.

Для пациентов с быстрым темпом прогрессии фиброза были характерны: снижение активности каталазы ($p = 0,04$), повышение уровня сывороточного железа ($p = 0,03$), ферритина ($p = 0,03$) и ВЭФР ($p = 0,03$) (табл. 4). Корреляционный анализ подтвердил наличие прямых достоверных взаимосвязей темпа прогрессии фиброза с уровнем ферритина ($r = 0,23$; $p = 0,04$) и концентрацией ВЭФР ($r = 0,21$; $p = 0,04$), что свидетельствует о влиянии нарушений метаболизма железа, процессов неоангиогенеза и

сосудистого ремоделирования на прогрессирование фиброза. У больных ХГ с высокой СРФ отмечался низкий уровень глюкозы ($p=0,002$) (табл. 4). Это может быть следствием снижения синтеза гликогена в печени, и подтверждается обратной взаимосвязью темпа прогрессирования фиброза с концентрацией глюкозы ($r=-0,65$; $p<0,001$).

Таблица 4

Значения исследуемых показателей в зависимости от темпов прогрессирования фиброза при ХГ, Ме (25; 75)

Показатели	СРФ медленная (n=67)	СРФ высокая (n=43)	p
Плотность печени, кПа	5,3 (4,6; 5,8)	8,5 (6,8; 8,9)	< 0,001
ГК, нг/мл	22,3 (17; 30,9)	52,3 (34; 78,6)	< 0,001
АФП, МЕ/мл	1,8 (1,3; 2,6)	2,5 (1,9; 3,5)	0,03
Каталаза, мкат/л	9,8 (6,7; 15,9)	8,6 (6,1; 12)	0,04
Железо сыв., мкмоль/л	15,4 (3; 19)	24,3 (13; 43)	0,03
Ферритин, нг/мл	55,2 (30; 101)	110,2 (42; 452)	0,03
ВЭФР, пг/мл	335,9 (177; 490)	387,0 (279; 710)	0,03
Глюкоза, ммоль/л	5,1 (4,6; 5,9)	3,1 (2,5; 4,1)	0,002

Примечание: p – достоверность различий.

Таким образом, прогрессирование фиброза при ХГ связано с активацией механизмов регенерации, сосудистой перестройки и неоангиогенеза, нарушением обмена железа, глюкозы и истощением АОС.

Модели неинвазивной оценки стадий, прогрессирования фиброза и риска развития цирроза печени. В рамках данного исследования были рассчитаны диагностические характеристики ГК для стратификации стадии ФП при ХГ, которые составили: чувствительность - 86,4%, специфичность – 91,9% при показателях воспроизводимости 80,9% и соответствия 88,9%. Площадь ROC-кривой ГК как предиктора ФП составила AUC 0,94±0,03 (доверительный интервал 0,86-0,98), $p<0,001$. Индекс Юдена для данного показателя равнялся 0,85 (рис. 10). Пороговое значение ГК для исключения ФП составило 42 нг/мл при чувствительности 91,9% и специфичности 93,2%. Стадия умеренного ФП (F1-2) у больных ХГ устанавливается при уровне ГК более 42 нг/мл и менее 70,3 нг/мл (табл. 5), стадия выраженного

ФП (F3) - при содержании ГК более 70,3 нг/мл и до 104,3 нг/мл, доклиническая стадия ЦП в исходе ХГ диагностируется при уровне ГК более 104,3 нг/мл (табл 6).

На модели ХГ было рассчитано уравнение множественной регрессии, позволяющее установить стадию ФП по трем параметрам: тромбоциты, альбумин и ФНО- α , которые обладали достаточной статистической значимостью и демонстрировали высокую корреляционную связь с плотностью печени ($r=0,9$, $0,89$ и $0,9$, соответственно). Формула для его расчета имеет вид: $\text{ИНДЕКС ФИБРОЗА} = 3,79 - 0,0056 \times \text{ТР} + 0,0855 \times \text{ФНО-}\alpha - 0,0352 \times \text{АЛЬБУМИН}$. Значение индекса фиброза в интервале от 0 до 0,5 включительно свидетельствует об отсутствии фиброза (стадия F0). Значение индекса фиброза в интервале от 0,6 до 2,5 включительно, соответствует умеренной стадии фиброза (F1-2), а значение индекса фиброза более 2,5 диагностирует выраженную стадию фиброза (F3-4). Диагностическая чувствительность данной математической модели составила 93,3%, специфичность – 83%, что сопоставимо с диагностическими характеристиками других современных моделей, но гораздо дешевле - 450-500 руб. Для оценки предсказательной ценности значимых маркеров ФП и выбора их пороговых значений были построены графики ROC кривых для параметров тромбоцитов, альбумина и ФНО- α (рис. 9).

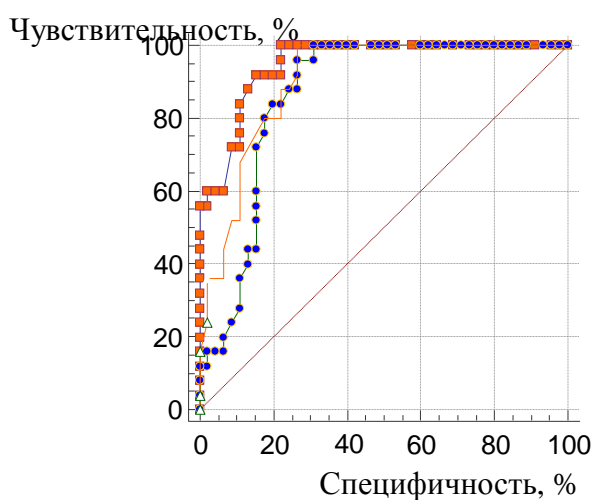


Рис. 9. ROC-кривые тромбоцитов,

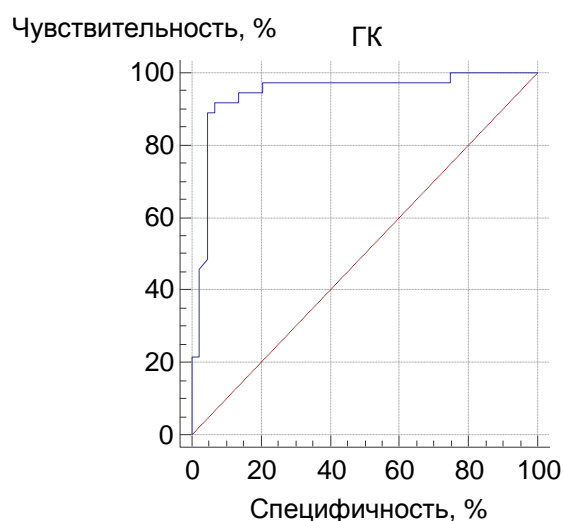


Рис. 10. ROC-кривая ГК.

альбумина и ФНО- α ; \circ – тромбоциты;

Δ - альбумин; \square – ФНО- α .

Площадь ROC-кривой тромбоцитов составила AUC $0,95 \pm 0,02$ (доверительный интервал 0,86-0,99), $p < 0,001$; индекс Юдена равнялся 0,78. Пороговое значение тромбоцитов для исключения ФП составило $282 \times 10^9/\text{л}$ (чувствительность – 100 %, специфичность – 77,8%). 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 равнялся 0,69. Пороговое значение альбумина для исключения ФП составило 47,3 г/л (чувствительность – 96%, специфичность – 73,3%). 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 равнялся 0,73. Пороговое значение ФНО- α для исключения ФП составило 1,9 пг/мл (чувствительность – 100%, специфичность – 73,3%).

Таким образом, инициация фиброза при ХГ верифицируется при значении количества тромбоцитов менее $282 \times 10^9/\text{л}$, альбумина менее 47,3 г/л и ФНО- α более 1,9 пг/мл. Стадия умеренного ФП (F1-2) устанавливается 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) верифицируется при количестве тромбоцитов в крови менее $200 \times 10^9/\text{л}$, уровне альбумина менее 44,1 г/л и значении ФНО- α более 2,8 пг/мл (табл. 5).

Таблица 5

Пороговые значения маркеров для оценки стадий ФП при ХГ

Стадии ФП	Предикторы прогрессирования ФП			
	ГК,нг/мл	Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Альбумин, г/л	ФНО- α ,пг/мл
F0 от F1-2	42	282	47,3	1,9
F1-2 от F3-4	70,3	200	44,1	2,8

В рамках данного исследования установлена значимая корреляционная связь СРФ с ГК ($r=0,6$; $p<0,001$), АФП ($r=0,49$; $p=0,001$) и глюкозой ($r=-0,65$; $p<0,001$), которые были рассмотрены нами в качестве предикторов прогрессирования ФП на модели ХГ. Площадь ROC-кривой ГК, как предиктора прогрессирования фиброза составила AUC $0,95\pm 0,02$ (доверительный интервал $0,88-0,98$), $p<0,001$ (рис. 11). Индекс Юдена для данного показателя равнялся $0,84$. Оптимальное пороговое значение ГК для дифференциации темпа прогрессирования ФП – $40,4$ нг/мл при чувствительности – $97,1\%$ и специфичности – 87% . Площадь ROC-кривой для АФП, как предиктора прогрессирования фиброза составила AUC $0,95\pm 0,02$ (доверительный интервал $0,88-0,98$), $p<0,001$ (рис. 12). Индекс Юдена для данного показателя равнялся $0,84$. Пороговое значение АФП для дифференциации темпа прогрессирования ФП составило $2,14$ МЕ/мл при чувствительности и специфичности $94,4$ и $78,1\%$ соответственно (табл 6).

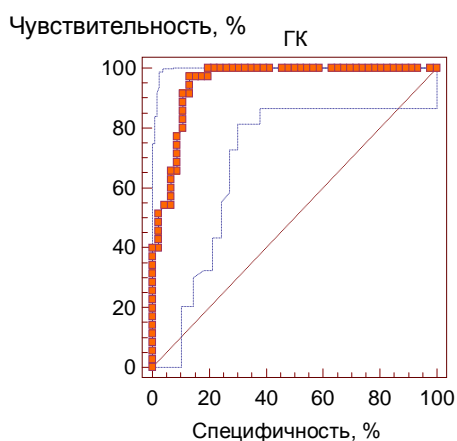


Рис. 11. ROC-кривая ГК.

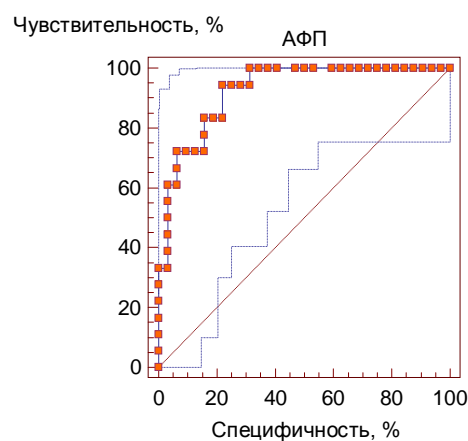


Рис. 12. ROC-кривая АФП.

Площадь ROC-кривой глюкозы, как предиктора прогрессирования фиброза составила AUC $0,99\pm 0,01$ (доверительный интервал $0,89-1,00$), $p<0,001$ (рис. 13). Индекс Юдена для данного показателя равнялся $0,96$. Оптимальное пороговое значение глюкозы для дифференциации темпа прогрессирования ФП – $4,1$ ммоль/мл при чувствительности – 100% и специфичности – $85,7\%$ (табл. 6).

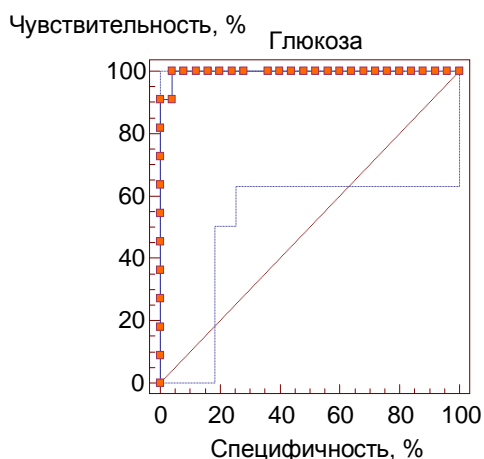


Рис. 13. ROC-кривая глюкозы.

Таким образом, высокий темп прогрессирования фиброза прогнозируется при концентрации ГК в крови более 40,4 нг/мл, уровне АФП более 2,14 МЕ/мл и значении глюкозы менее 4,1 ммоль/л.

Кроме этого, была установлена достоверная взаимосвязь плотности печеночной ткани по данным УЗЭ с АФП ($r=0,53$), ИЛ-6 ($r=0,39$) и Г-КСФ ($r=0,41$), имеющих хорошую предсказательную ценность для диагностики перехода ХГ в ЦП. Площадь ROC-кривой для АФП, как предиктора ЦП составила $AUC\ 0,90\pm 0,04$ (доверительный интервал 0,78-0,97), $p<0,001$; индекс Юдена равнялся 0,63 (рис. 14). Оптимальное пороговое значение АФП для дифференциации стадии F4 от F1-3 составило 5,13 МЕ/мл при чувствительности – 70% и специфичности – 93,1%. Площадь ROC-кривой для ИЛ-6, как предиктора ЦП составила $AUC\ 0,93\pm 0,03$ (доверительный интервал 0,86-0,98), $p<0,001$; индекс Юдена равнялся 0,72 (рис. 15).

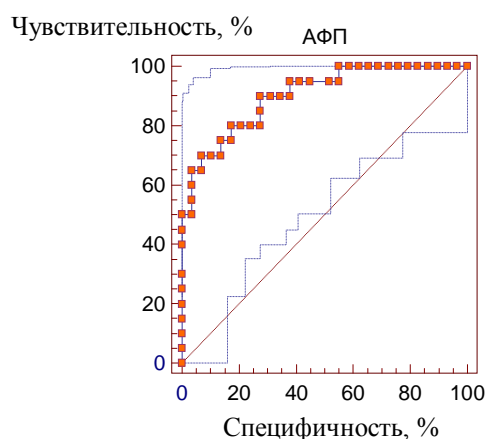


Рис. 14. ROC-кривая АФП.

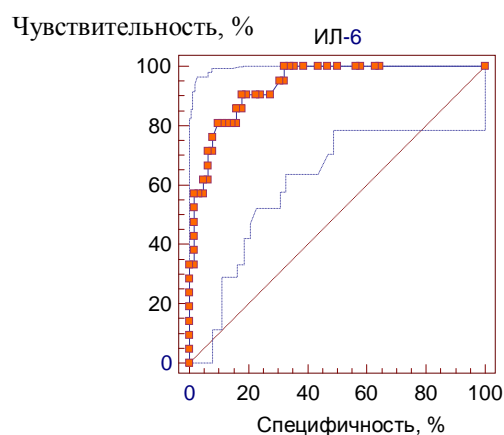


Рис. 15. ROC-кривая ИЛ-6.

Пороговое значение ИЛ-6 для дифференциации стадии F4 от F1-3 – 4,4 пг/мл при чувствительности – 81,8% и специфичности – 88,9% (табл 6).

Площадь ROC-кривой для Г-КСФ, как предиктора ЦП составила AUC 0,92±0,03 (доверительный интервал 0,81-0,97), $p < 0,001$; индекс Юдена равнялся 0,72 (рис. 16).

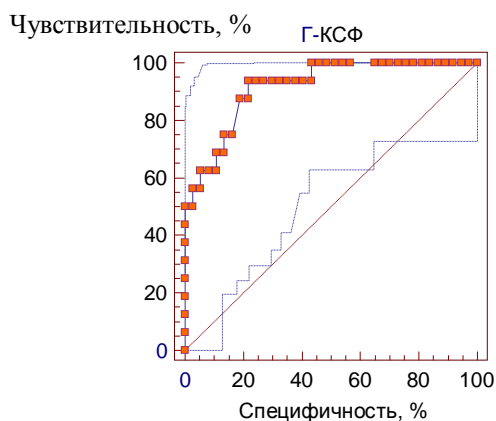


Рис. 16. ROC-кривая Г-КСФ.

Пороговое значение Г-КСФ для дифференциации стадии F4 от F1-3 составило 14,8 пг/мл при чувствительности – 93,7% и специфичности – 78,4% (табл. 6).

Таблица 6

Операционные характеристики маркеров фиброза и цирроза печени

Тесты	Точка разделения	Чувствительность, %	Специфичность, %
Оценка темпа прогрессирования ФП при ХГ			
ГК, нг/мл	40,4	97,1	87
АФП, МЕ/мл	2,14	94,4	78,1
Глюкоза, ммоль/л	4,1	100	85,7
Диагностика перехода ХГ в ЦП			
ГК, нг/мл	104,3	86,4	91,9
АФП, МЕ/мл	5,13	70	93,1
ИЛ-6, пг/мл	4,4	81,8	88,9
Г-КСФ, пг/мл	14,8	93,7	78,4

Таким образом, переход ХГ в ЦП диагностируется при сывороточной концентрации АФП более 5,13 МЕ/мл, уровне ИЛ-6 более 4,4 пг/мл и значении Г-КСФ более 14,8 пг/мл. Причем, данные предикторы можно

использовать как по отдельности, так и в совокупности для увеличения предсказательной ценности в отношении верификации ЦП.

Исследование комбинаций аллельных вариантов исследуемых генов в когортах здоровых лиц и больных хроническим гепатитом С в Пермском крае. При анализе ОНП в генах гиалуроновой кислоты *HAS1* (G/A), каталазы *CAT* (G262A), глутатион-пероксидазы *GPX4* (C718T), аполипопротеина-В *ApoB* (R3500Q), интерлейкина *IL28B* (C/T) и интерлейкина *IL17F* (C11139G) у 50 доноров без хронических заболеваний печени и 92 пациентов с ХГС достоверных различий частоты встречаемости аллельных вариантов не было найдено. При изучении ОНП гена *VEGFA* (G-634C) гомозигота CC была найдена только в группе пациентов с ХГС в 12,5% случаев, а в популяции здоровых не была обнаружена ($p < 0,001$). То есть, носительство аллеля С гена *VEGFA* (G-634C) преимущественно в виде гомозиготы CC является фактором риска хронизации гепатита С.

При анализе частоты встречаемости ОНП исследуемых генов в зависимости от пола у 43 мужчин и 49 женщин с ХГ статистически значимые различия были получены для аллельных вариаций гена *VEGFA* (G-634C). Гетерозигота GC чаще регистрировалась у мужчин по рецессивной модели наследования ($p = 0,04$) (рис. 17). То есть, имеется ассоциация минорной аллели С в виде генотипа GC гена *VEGFA* (G-634C) с мужским полом.

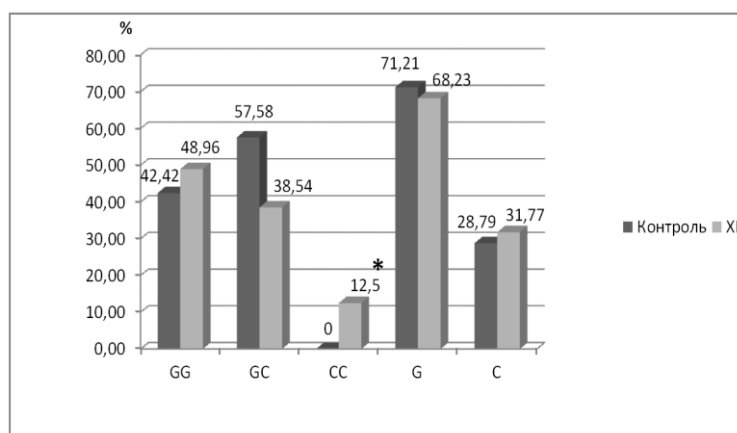


Рис. 17. Частота обнаружения аллельных пар в полиморфных локусах гена *VEGFA* (G-634C) в когортах здоровых и больных ХГ.

При сравнении встречаемости аллельных вариаций гена *IL28B* (C/T) в группах с разными генотипами вируса были получены статистически значимые различия частоты обнаружения гетерозиготы СТ, которая с высокой вероятностью была найдена у 45 пациентов с генотипом HCV-1 с наследованием по рецессивному типу ($p=0,04$). То есть, имеется ассоциация неблагоприятного аллеля Т в виде генотипа СТ гена *IL28B* (C/T) с хронизацией заболевания при инфицировании HCV-1.

Влияние полиморфизмов изучаемых генов на скорость развития фиброза. При анализе встречаемости аллельных вариаций гена *CAT* (G262A) генотип GG в 1,47 раз чаще встречался ($p=0,03$), а аллель G в 1,2 раза чаще ($p=0,04$) у 56 больных ХГ с медленным темпом прогрессии фиброза. Напротив, генотип GA и, так называемый «профиброгенный» аллель А, с высокой вероятностью достоверно чаще определяли у 36 пациентов с высокой СРФ в 1,73 раза ($p=0,04$) и в 1,86 раз ($p=0,04$) соответственно, чем при медленной СРФ по рецессивной модели наследования (рис. 18).

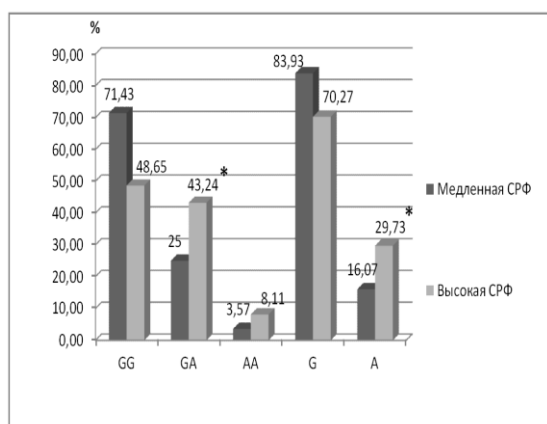


Рис. 18. Частота обнаружения ОНП гена *CAT* (G262A) у больных ХГ с медленной и высокой СРФ.

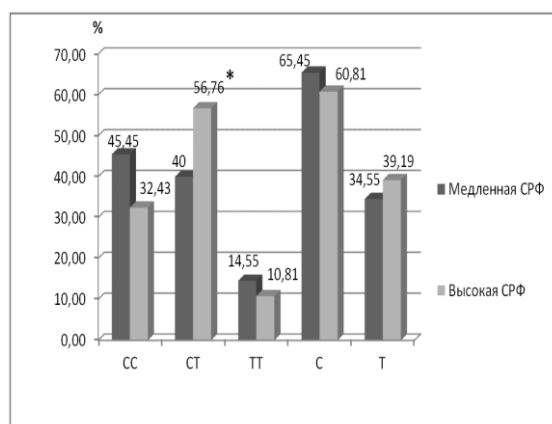


Рис. 19. Частота обнаружения ОНП гена *GPX4* (C718T) у больных ХГ с медленной и высокой СРФ.

При анализе ОНП гена *GPX4* (C718T) в группах больных ХГ в зависимости от СРФ были получены статистически значимые различия частоты обнаружения генотипа СТ: при высокой СРФ этот генотип с высокой вероятностью встречался в 1,42 раза чаще ($p=0,04$), чем при медленном темпе прогрессирования фиброза по рецессивной модели

наследования (рис. 19). Таким образом, ассоциации аллеля гена *CAT* +262A и аллеля гена *GPX4* +718T с высокой СРФ при ХГ дает основание называть эти аллели «профиброгенными».

Анализ влияния полиморфизмов изучаемых генов в когорте больных ХГ на продукцию патогенетически значимых факторов по таблице сопряженности (кросстабуляции) выявил взаимосвязь полиморфизма гена *CAT* (G262A) со снижением активности ферментов каталазы ($p=0,005$) и ГЛП ($p=0,04$). Найдены корреляции полиморфизма гена *GPX4* по локусу C718T с гиперпродукцией МДА, что может приводить к активации процессов перекисидации липидов и прогрессированию заболевания. При анализе гена *VEGFA* в локусе G-634C наблюдалась зависимость с увеличением выработки ВЭФР ($p=0,035$), участвующего в активации механизмов сосудистой перестройки, неоангиогенеза, эндотелиальной дисфункции, что приводит к прогрессированию фиброза. Таким образом, полиморфизмы генов *CAT* (G262A), *GPX4* (rs713041), *IL28B* (C/T) и *VEGFA* (G-634C) могут оказывают влияние на продукцию патогенетически значимых факторов, что приводит к активации патологических механизмов и, вероятно прогрессированию заболевания и подтверждает нашу гипотезу о возможном негативном влиянии полиморфизмов исследуемых генов на характер течения заболевания.

Исследование сочетанного влияния полиморфизмов исследуемых генов на темпы прогрессии фиброза. Для оценки риска прогрессирования фиброза в зависимости от носительства пациентов генотипов генов *CAT* (G262A), *GPX4* (C718T), *IL28B* (C/T) и *VEGFA* (G-634C) были сформированы две шкалы баллов. По одной шкале с появлением у пациента ХГ хотя бы одной мутантной аллели риска по этим генам возрастает вероятность быстрого прогрессирования заболевания. Вторая оценочная шкала заключалась в суммировании благоприятных и неблагоприятных аллелей и генотипов у каждого больного. Для упрощения суммирования проведено кодирование с присвоением каждому «профибротическому» аллелю риска «-

1» балл, а защитному протективному генотипу генов *CAT* (G262A), *GPX4* (C718T), *IL28B* (C/T) и *VEGFA* (G-634C) «+1» с последующим суммированием. Суммарный балл «- 2» и ниже (то есть группы с большим количеством профибротических аллелей) имели 47% больных с быстро прогрессирующим ФП и только 28,5% пациентов с медленно прогрессирующим течением ХГС.

Оценка обратного развития фиброза печени при использовании препаратов интерферона. С целью уточнения возможности использования предложенного комплекса основных лабораторных маркеров для оценки изменения фиброза после терапии препаратами интерферона короткого и пролонгированного действия мы провели сравнительное исследование на модели ХГ. Исходно и после завершения курса терапии у пациентов обеих групп оценивались следующие параметры в сыворотке крови: маркер фиброза – ГК, параметр регенерации - АФП, маркер холестаза - ГГТП, показатель ПОЛ - МДА, антиоксидантные ферменты каталазу и ГЛП, цитокины и ВЭФР. Пациенты обеих групп до начала терапии были сопоставимы по возрасту ($p=0,07$), длительности заболевания ($p=0,15$), СРФ ($p=0,25$), плотности печени по данным УЗЭ ($p=0,06$), а также не имели достоверных различий по средним концентрациям исследуемых лабораторных параметров.

При терапии интерфероном пролонгированного действия по схеме «ПегИнtron+рибавирин» наблюдался положительный клинический эффект. При опросе пациентов регистрировалось уменьшение жалоб на слабость с 30 до 5%, чувства тяжести в правом подреберье с 20 до 5%. Частота выявления гепатомегалии сократилась с 75 до 10%. Непосредственный вирусологический ответ был получен у 85% пациентов, устойчивый вирусологический ответ - у 75% лиц. Положительный биохимический ответ при терапии пролонгированным интерфероном был зафиксирован у 85% больных.

Антифибротический эффект при данной схеме был достигнут у 69% пациентов. Количество больных со стадией F0 увеличилось с 25 до 40%, со стадиями F3-4 уменьшилось с 25 до 10%, что свидетельствует о регрессии фиброза (рис. 20).

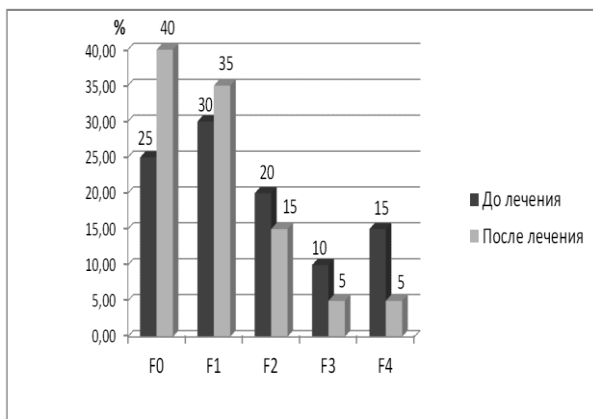


Рис. 20. Динамика фиброза при терапии по схеме «ПегИнтерон+Р».

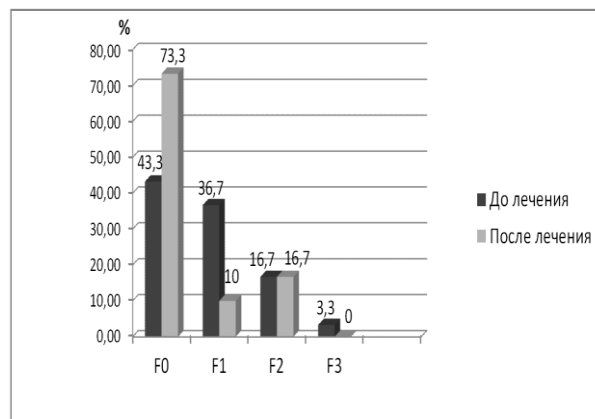


Рис. 21. Динамика фиброза при терапии по схеме «Альтевир+Р».

В пользу обратного развития фиброза свидетельствовало уменьшение плотности печени по данным УЗЭ ($p=0,03$), ($p=0,02$) и снижение уровня прямого маркера фиброза - ГК ($p=0,01$) (табл. 7).

Таблица 7

Динамика параметров фиброза при терапии интерферонами

Показатели	«ПегИнтерон+рибавирин»		«Альтевир+рибавирин»	
	до лечения	после	до лечения	после
СРФ, балла/год	0,31±0,26	0,18±0,16 ¹	0,21±0,2	0,1±0,1 ²
Плотность печени, кПа	6,8 (6,1;8,6)	5,9 (5,3;6,7) ¹	6,3 (5,0;7,1)	5,7 (4,4;6,6) ²
ГК, нг/мл	36,3(22;133,6)	17,5 (13,4;31) ¹	43,9(26,9;90,4)	23,69(13,8;25) ²

Примечание: ¹ – достоверность различий при лечении пролонгированным интерфероном; ² - достоверность различий при терапии интерфероном короткого действия.

После лечения у пациентов отмечено уменьшение концентрации АФП ($p=0,01$), ГГТП ($p=0,03$), МДА ($p=0,01$), ФНО- α ($p=0,03$), ИЛ-6 ($p=0,01$) и ВЭФР ($p=0,01$). При этом, активность антиоксидантных ферментов каталазы и ГЛП значимо повысилась ($p<0,001$ и $p<0,001$) (табл. 8).

Динамика показателей при терапии интерферонами, Ме (25; 75)

Показатели	«ПегИнтрон+рибавирин»		«Альтевир+рибавирин»	
	до лечения	после	до лечения	после
АФП, МЕ/мл	4,89(3,12;17,5)	1,9(1,66;2,4) ¹	2,04(1,18;2,67)	1,9 (1,4; 2,3)
ГГТП, Ед/л	33 (25; 62)	16(11,5;33) ¹	21 (15; 34)	12,05 (11; 17) ²
МДА, мкмоль/л	7,4 (5,2; 10,6)	3,1 (2,2; 3,6) ¹	6,5 (2,8; 12,9)	2,3 (1,8; 2,8) ²
Каталаза, мкат/л	11,5(5,5;14,7)	17 (12,7; 21) ¹	10,6(6,7;14,6)	19,2(16,7;24,7) ²
ГЛП, мкмоль/л	8,2 (5,5; 12)	14(11,4;17,9) ¹	11 (7,6; 13,5)	18,8 (12,9;24) ²
ФНО-α, пг/мл	1,9 (1,1; 3,0)	1,5 (1,3; 2,2) ¹	1,8 (1,0; 2,9)	1,4 (0; 1,1) ²
ИЛ-6, пг/мл	1,2 (0,3; 7,95)	0,8 (0; 1,5) ¹	0,7 (0,2; 3,1)	0 (0; 0,6) ²
ВЭФР, пг/мл	325,2 (283;526)	185,5 (138; 379) ¹	320,5 (198; 559)	266,8 (97; 322) ²

Примечание: ¹ – достоверность различий при лечении пролонгированным интерфероном; ² - достоверность различий при терапии интерфероном короткого действия.

После лечения отечественным короткоживущим интерфероном по схеме «Альтевир+рибавирин» наблюдался положительный клинический эффект у большинства пациентов с ХГ, частота выявления гепатомегалии сократилась с 80 до 7%. Антифибротический эффект при данной схеме был достигнут у 70% больных. Количество больных со стадией F0 увеличилось с 43 до 73%, а число пациентов со стадиями F1-2 уменьшилось с 53,4 до 26,7%, что свидетельствует о регрессии фиброза (см. рис. 21). Было зафиксировано уменьшение плотности печени по УЗЭ (p=0,02), СРФ (p=0,02) и снижение уровня ГК (p=0,001) (см. табл. 7). Обратное развитие фиброза при лечении интерфероном короткого действия подтверждалось положительной динамикой большинства вновь выявленных лабораторных маркеров фиброза: уменьшением концентрации ГГТП (p=0,002), МДА (p=0,03), ФНО-α (p=0,03), ИЛ-6 (p=0,01) и ВЭФР (p=0,01) при повышении активности антиоксидантных ферментов каталазы и ГЛП (p<0,001 и p<0,001) (см. табл. 8). Непосредственный вирусологический ответ был получен у 93%

пациентов, устойчивый вирусологический ответ - у 86,6% лиц. Положительный биохимический ответ при терапии интерфероном короткого действия был зафиксирован у 90% больных.

Таким образом, терапия интерферонами короткого и пролонгированного действия сопровождается достоверным снижением активности воспаления, холестаза, процессов сосудистой перестройки и перекисидации липидов при нормализации механизмов антиоксидантной защиты, что сопровождается уменьшением выраженности фиброза и скорости его развития.

На основании проведенного исследования разработана модель патогенетических механизмов формирования и прогрессирования фиброза при ХЗП (рис. 22) и предложена модель лабораторного алгоритма, которая позволяет оценить выраженность, темпы и генетический риск прогрессирования фиброза, прогнозировать развитие цирроза и оценить антифибротическую эффективность терапии (рис. 23).

Этиологический фактор при ХЗП (вирус, алкоголь)

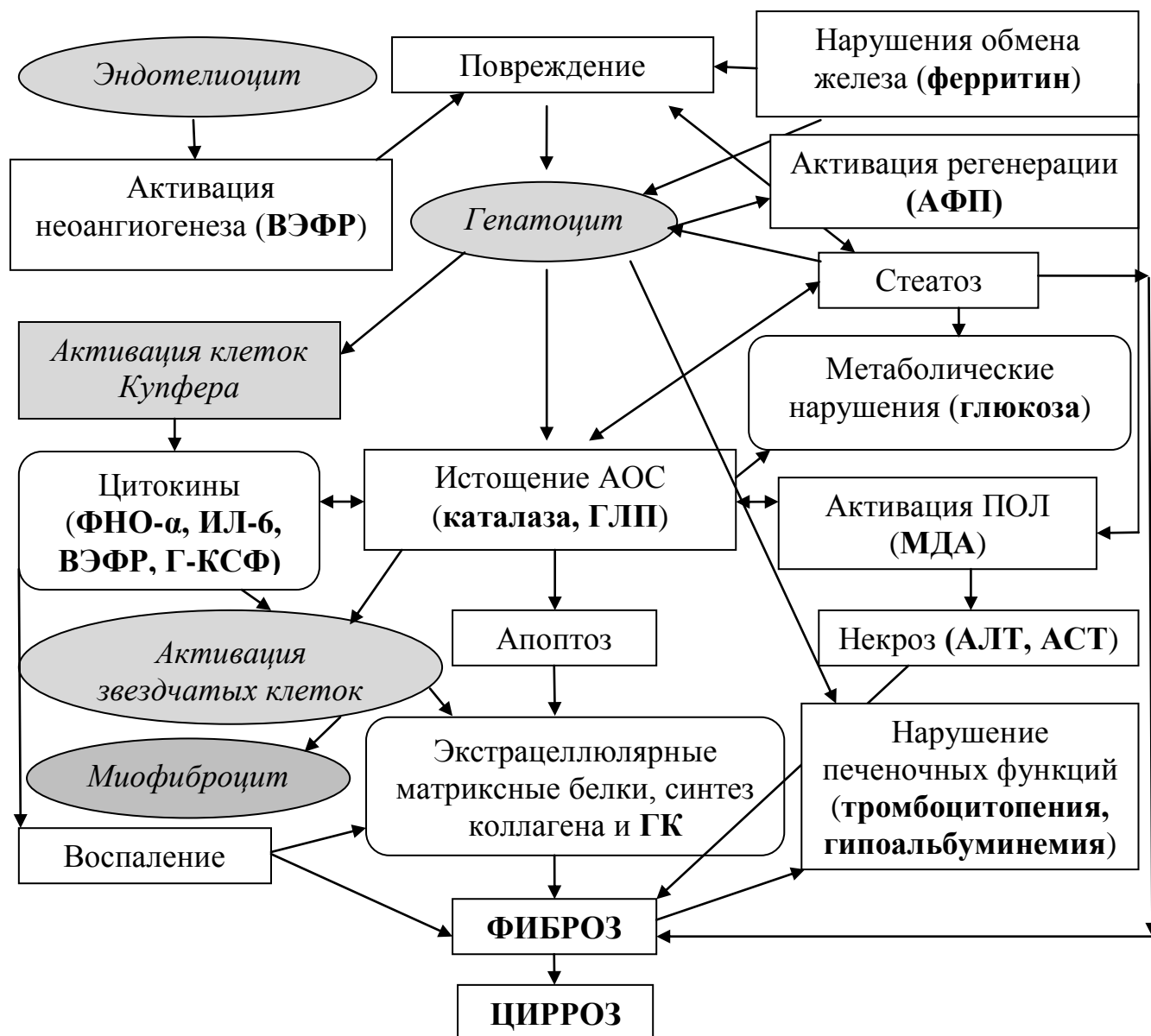


Рис. 22. Модель патогенетических механизмов развития фиброза при ХЗП.

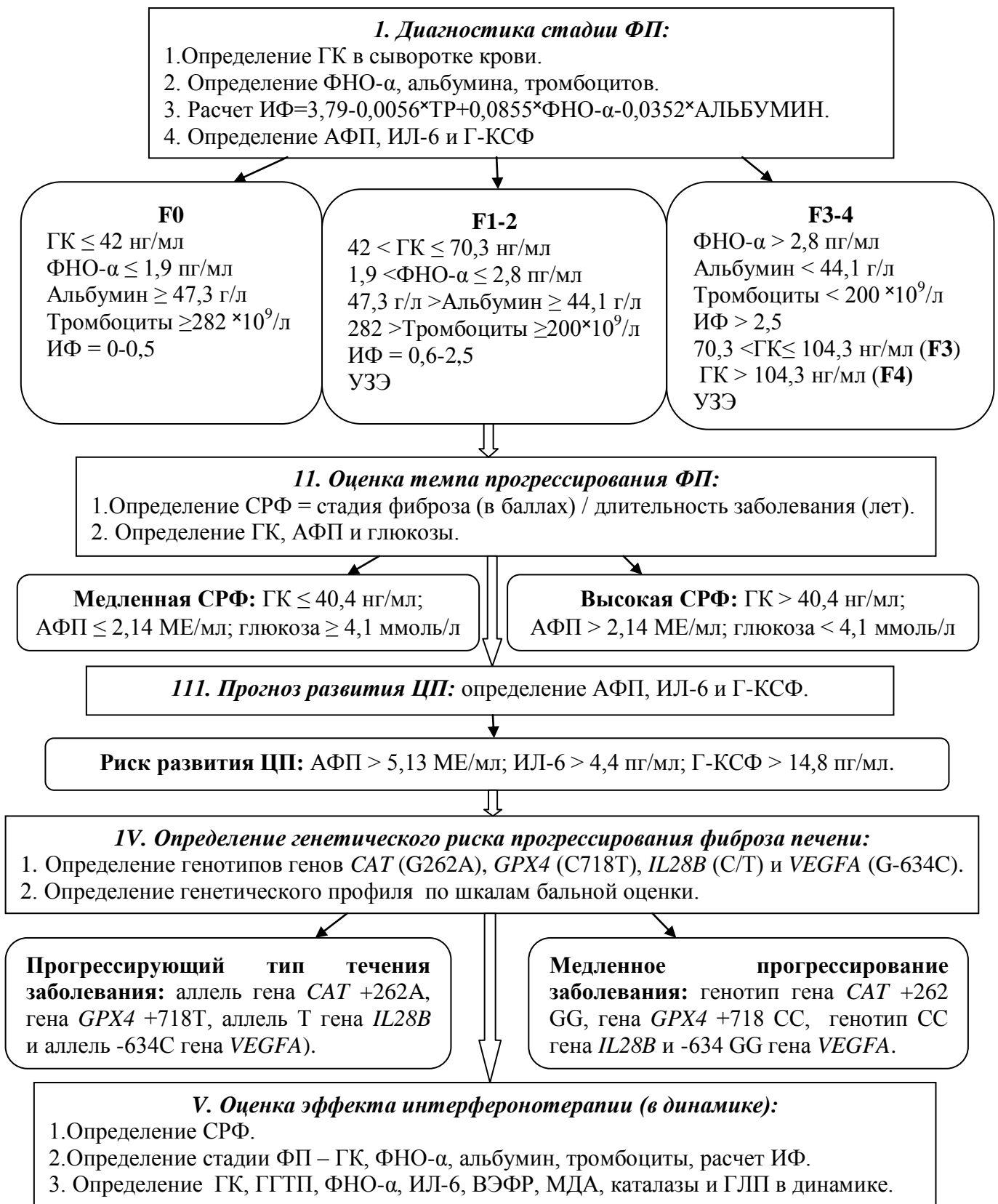


Рис. 23. Модель лабораторного алгоритма диагностики фиброза печени.

ВЫВОДЫ

1. Сформирован комплекс лабораторных тестов, характеризующих при хронических заболеваниях печени процессы активации перекисного окисления липидов, истощения механизмов антиоксидантной защиты, гиперпродукции провоспалительных цитокинов, нарушения обмена железа, усиления процессов регенерации и неоангиогенеза в печени, который отражает степень повреждения её ткани и маркирует выраженность фиброза.

2. У пациентов с хроническими заболеваниями печени установлены значимые ассоциации степени плотности печени по данным ультразвуковой эластографии и значениями лабораторных параметров: гиалуроновой кислоты, альфа-фетопротейна, альбумина, тромбоцитов, ферритина, фактора некроза опухоли-альфа, интерлейкина-6, васкулоэндотелиального фактора роста и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.

3. Применение рассчитанного индекса фиброза по уровню тромбоцитов, фактора некроза опухоли-альфа и альбумина, а также использование пороговых значений гиалуроновой кислоты позволяет дифференцировать стадии фиброза от F0 до F4 при хронических заболеваниях печени.

4. Скорость развития фиброза печени ассоциирована с повышением уровней гиалуроновой кислоты и альфа-фетопротейна и снижением концентрации глюкозы.

5. Увеличение маркеров фиброза и воспаления: гиалуроновой кислоты, альфа-фетопротейна, интерлейкина-6 и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора прогнозирует риск перехода фиброза печени в цирроз.

6. Индивидуальные особенности прогрессирования фиброза печени определяются полиморфизмами генов каталазы *CAT* (G262A), глутатионпероксидазы *GPX4* (C718T), интерлейкина *IL28B* (C/T) и васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA* (G-634C). Прогрессирующий тип течения хронического гепатита С ассоциирован с наличием аллеля гена *CAT* +262A, гена *GPX4* +718T, аллеля T гена *IL28B* и

аллеля -634C гена *VEGFA* и, а медленное течение заболевания связано с генотипом гена *CAT* +262 GG, гена *GPX4* +718 CC, генотипом CC гена *IL28B* и -634 GG гена *VEGFA*.

7. Носительство аллеля C гена васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA* (G-634C) в виде гомозиготы CC является фактором риска хронизации гепатита С.

8. Терапия интерферонами короткого и пролонгированного действия сопровождается достоверным снижением активности воспаления, холестаза, процессов сосудистой перестройки и пероксидации липидов при нормализации механизмов антиоксидантной защиты, что сопровождается уменьшением выраженности фиброза и скорости его развития.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для комплексного обследования пациентов с хроническими заболеваниями печени применение предлагаемого диагностического лабораторного алгоритма позволяет оценить выраженность, темпы и генетический риск прогрессирования фиброза, прогнозировать развитие цирроза и оценить антифибротическую эффективность терапии.

2. Для дифференциации стадии фиброза печени оптимально использовать определение в сыворотке крови уровня гиалуроновой кислоты и рассчитывать индекс фиброза с чувствительностью 93,3% и специфичностью 83%. Фиброз печени (F0) исключается при сывороточной концентрации гиалуроновой кислоты менее или равном 42 нг/мл, стадия умеренного фиброза (F1-2) устанавливается при уровне гиалуроновой кислоты более 42 нг/мл и менее или равном 70,3 нг/мл, стадия выраженного фиброза (F3) - при концентрации данного показателя более 70,3 нг/мл и менее или равном 104,3 нг/мл, стадия F4 – при значении ГК более 104,3 нг/мл. Значение индекса фиброза в интервале от 0 по 0,5 свидетельствует об отсутствии фиброза (стадия F0), значение индекса фиброза от 0,6 до 2,5 соответствует умеренной стадии

фиброза (F1-2), индекс фиброза более 2,5 диагностирует выраженную стадию фиброза (F3-4).

3. Использование расчетных пороговых значений показателей альбумина, фактора некроза опухоли-альфа и тромбоцитов позволяет дифференцировать отсутствие фиброза от его умеренных и выраженных стадий. Стадия F0 верифицируется при значении количества тромбоцитов более $282 \times 10^9/\text{л}$, альбумина более 47,3 г/л и фактора некроза опухоли-альфа менее 1,9 пг/мл. Стадия умеренного ФП (F1-2) устанавливается при количестве тромбоцитов 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 фактора некроза опухоли-альфа более 1,9 пг/мл и менее или равном 2,8 пг/мл. Стадия выраженного ФП (F3-4) верифицируется при количестве тромбоцитов менее $200 \times 10^9/\text{л}$, уровне альбумина менее 44,1 г/л и значении фактора некроза опухоли-альфа более 2,8 пг/мл.

4. Уровни гиалуроновой кислоты более 40,4 нг/мл, альфа-фетопротейна более 2,14 МЕ/мл и глюкозы менее 4,1 ммоль/л свидетельствуют о высоком темпе развития фиброза печени.

5. Риск развития цирроза печени увеличивается при значении гиалуроновой кислоты более 104,3 нг/мл, уровне альфа-фетопротейна более 5,13 МЕ/мл, концентрации интерлейкина-6 более 4,4 пг/мл и значении гранулоцитарного колониестимулирующего фактора более 14,8 пг/мл.

6. Исследование полиморфизма гена васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA* (G-634C) следует использовать в качестве оценки риска хронизации гепатита С.

7. Исследование однонуклеотидных полиморфизмов генов *CAT* (G262A), *GPX4* (C718T), *IL28B* (C/T) и *VEGFA* (G-634C) при ХГ позволяет определить генетический риск прогрессирования фиброза печени. При наличии у пациента хотя бы одной мутантной аллели риска гена *CAT* +262A, гена *GPX4* +718T, аллеля T гена *IL28B* и аллеля -634C гена *VEGFA* возрастает вероятность более быстрого прогрессирования заболевания.

8. В качестве динамических критериев оценки антифибротического эффекта этиотропной терапии гепатита следует определять скорость развития фиброза и динамику показателей: гиалуроновой кислоты, гамма-глутамилтранспептидазы, альфа-фетопротейна, фактора некроза опухоли-альфа, интерлейкина-6, васкулоэндотелиального фактора роста, малонового диальдегида, каталазы и глутатион-пероксидазы. Положительная динамика данных маркеров свидетельствует об обратном развитии фиброза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК РФ

1. Щёкотов В.В. Взаимосвязь маркеров эндотелиальной дисфункции и фиброза при хроническом гепатите и циррозе печени / В.В. Щёкотов, А.П. Щёктова, И.А. Булатова // **Клиницист**. – 2011. - № 3. – С. 68-72.

2. Щёктова А.П. Моноцитарный хемоттрактантный протеин-1, фагоцитоз, маркеры эндотелиальной дисфункции и фиброза при хроническом гепатите и циррозе печени / А.П. Щёктова, В.В. Щёкотов, И.А. Булатова, С.Э. Латышева, О.Ю. Ненашева, А.В. Кривцов, Г.Г. Ларионова // **Современные проблемы науки и образования**. – 2011. - № 5. URL: www.science-education.ru/99-4852.

3. Щёктова А.П. Чувствительность и специфичность определения гиалуроновой кислоты, коэффициента де Ритиса и ВЭФР для диагностики ХГ и ЦП / А.П. Щёктова, И.А. Булатова, А.П. Ройтман // **Пермский медицинский журнал**. – 2013. - Т. 30. - № 4. – С. 84-89.

4. Булатова И.А. Васкулоэндотелиальный фактор роста и полиморфизм гена VEGF(rs2010963) в патогенезе хронического вирусного гепатита С / И.А. Булатова // **Современные проблемы науки и образования**. – 2013. – № 6; URL: <http://www.science-education.ru/113-11340>

5. Булатова И.А. Взаимосвязь тяжести поражения печени с полиморфизмом гена интерлейкина 28В у больных хроническим гепатитом С / И.А. Булатова, А.В. Кривцов, А.П. Щёктова, Г.Г. Ларионова, В.В. Щёкотов // **Фундаментальные исследования**. – 2013. – Т. 2. - №12. – С. 186-190.

6. Щёктова А.П. Особенности окислительного стресса при хроническом гепатите С / А.П. Щёктова, П.В. Улитина, И.А. Булатова, О.Ю. Ненашева // **Пермский медицинский журнал**. – 2014. – Т. 1. - № 1. – С. 98-102.

7. Булатова И.А. Исследование интерлейкина-17 и полиморфизма гена интерлейкина-17F (rs763780) при хроническом гепатите С / И.А. Булатова // **Пермский медицинский журнал**. – 2014. – Т. 1. - № 1. – С. 103-108.

8. Булатова И.А. Фактор некроза опухоли-альфа, циркулирующие иммунные комплексы и фагоцитоз при хроническом гепатите С / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, А.В. Кривцов, В.В. Щёкотов, Н.И. Насибуллина, Е.А. Калугина // **Пермский медицинский журнал**. – 2014. - № 2. – Т. XXXI1. – С. 68-72.

9. Булатова И.А. Значение малонового диальдегида и глутатионтрансферазы в оценке поражения печени и мониторинге терапии при хроническом гепатите С / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, А.В. Кривцов, П.В. Улитина, Г.Г. Ларионова, С.В. Падучева // **Фундаментальные исследования**. – 2014. – Т. 2. - № 4. – С. 246-251.

10. Булатова И.А. Динамика гепатофиброза и ангиогенеза у больных хроническим гепатитом С на фоне противовирусной терапии / И.А. Булатова // **Современные проблемы науки и образования**. – 2014. – № 4.; URL: <http://www.science-education.ru/118-13424>

11. Булатова И.А. Супероксиддисмутаза и глутатионредуктаза при хроническом гепатите С и неалкогольной жировой болезни печени / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, К.Н. Суздальцева, В.В. Щёкотов, П.В. Улитина, Е.В. Жижелев // **Фундаментальные исследования**. – 2014. – Т. 3. - № 7. – С. 455-459.

12. Булатова И.А. Взаимосвязь содержания малонового диальдегида, активности глутатионпероксидазы и полиморфизма гена GPX4 (718C/T) при хроническом гепатите С / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, А.В. Кривцов, В.В. Щёкотов, О.Ю. Ненашева // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2014. - № 10. – С. 15-18.

13. Булатова И.А. Метаболические нарушения и полиморфизм генов β 2-адренергического рецептора и аполипопротеина-В при хроническом гепатите С и неалкогольной жировой болезни печени / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, А.В. Кривцов, В.В. Щёкотов, Н.И. Насибуллина, К.Н. Суздальцева, Е.В. Жижелев // **Клиническая медицина**. – 2015. – № 1. – С. 35-41.

14. Булатова И.А. Полиморфизм rs1001179 гена каталазы и оксидантный стресс у больных хроническим гепатитом С и язвенным колитом / И.А. Булатова, Ю.И. Третьякова, В.В. Щёкотов, А.П. Щёктова, П.В. Улитина, А.В. Кривцов, О.Ю. Ненашева // **Терапевтический архив**. – 2015. - № 2. – С. 49-53.

15. Щёкотов В.В. Влияние противовирусной терапии хронического гепатита С на синтез цитокинов и процессы фиброобразования в печени / В.В. Щёкотов, И.А. Булатова, А.П. Щёктова, Н.И. Насибуллина, Г.Г. Ларионова, А.И. Павлов // **Клиницист**. – 2015. - № 2. – С. 4-11.

16. Булатова И.А. Неинвазивная оценка степени выраженности фиброза печени и значение полиморфизма гена гиалуроновой кислоты при хроническом гепатите С / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, А.В. Кривцов, В.В. Щёкотов, А.И. Павлов // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2015. – № 3. – 18-22.

17. Щёко́тов В.В. Неинвазивная оценка темпа прогрессирования фиброза печени / В.В. Щёко́тов, И.А. Булатова, А.П. Щёко́това, Н.И. Насибуллина, С.В. Падучева // **Современные проблемы науки и образования**. – 2016. – № 1; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=24063>.

18. Булатова И.А. Влияние фактора некроза опухоли альфа и полиморфизма его гена (RS1800629) на тяжесть и прогрессирование хронического гепатита и язвенного колита / И.А. Булатова, Ю.И. Третьякова, А.П. Щёко́това, В.В. Щёко́тов, А.В. Кривцов, Н.И. Насибуллина // **Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология**. – 2016. – Т.127. – №3. – С. 9-14.

Публикации в других изданиях

19. Shchekotova A.P. Endothelial Dysfunction, Liver Functional Tests and Fibrosis in Chronic Liver Diseases / A.P. Shchekotova, V.V. Shchekotov, I.A. Bulatova, A.V. Tuev // European Congress of Internal Medicine. - Prague, Czech Republic, 2013. (электронная).

20. Булатова И.А. Роль провоспалительных цитокинов в фиброгенезе при хроническом гепатите С / И.А. Булатова, А.П. Щёко́това, Н.И. Насибуллина // Сборник тезисов. – Баку, 2013 г. (электронная).

21. Bulatova I.A. The relationship of metabolic disorders and severity of liver disease with gene polymorphism β 2-adrenergic receptor in chronic hepatitis C / I.A. Bulatova, A.P. Schekotova, N.I. Nasibullina, V.V. Schekotov // Prague European Days of Internal Medicine. - Prague, Czech Republic, 2014. (электронная).

22. Bulatova I.A. Polymorphism eNOS3 (rs1799983) gene and its relationship with the severity of inflammation in chronic hepatitis C and ulcerative colitis / I.A. Bulatova, Y.I. Tretyakova, V.V. Schekotov, A.P. Schekotova // Prague European Days of Internal Medicine. - Prague, Czech Republic, 2014. (электронная).

23. Булатова И.А. Влияние полиморфных вариантов генов CYP4 (718C/T) и GSTP1 (Ile105Val) на течение хронического гепатита С / И.А. Булатова, А.В. Кривцов, А.П. Щёко́това, П.В. Улитина, О.Ю. Ненашева // Материалы XIX Российского конгресса «Гепатология сегодня». – Москва, 2014 г. - С. 19, 109.

24. Булатова И.А. Роль сывороточных цитокинов в прогрессировании хронического гепатита С / И.А. Булатова, В.В. Щёко́тов, Н.И. Насибуллина, А.П. Щёко́това // Сборник статей. Научная сессия Пермской государственной медицинской академии им. ак. Е.А. Вагнера. Навстречу 100-летию высшего медицинского образования на Урале. – Пермь, 2014. – Т. 111. – С. 16-20.

25. Щёко́това А.П. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита в фазе реактивации хронического гепатита С / А.П. Щёко́това, И.А. Булатова, П.В. Улитина // Сборник статей. Научная сессия Пермской государственной медицинской академии им. ак. Е.А. Вагнера. Навстречу 100-летию высшего медицинского образования на Урале. – Пермь, 2014. – Т. 111. – С. 187-189.

26. Schekotova A.P. Glutathioneperoxidase, glutathionetransferase and polymorphism of their genes in chronic hepatitis C / A.P. Schekotova, I.A. Bulatova, A.V. Kryvtsov // European and Swiss Congress of Internal Medicine. - Geneva, Switzerland, 2014. (электронная).

27. Schekotova A.P. Proinflammatory cytokines, indicators of cytolysis and fibrosis in chronic hepatitis / A.P. Schekotova, I.A. Bulatova, V.V. Shchekotov, N.I. Nasibullina // European and Swiss Congress of Internal Medicine. - Geneva, Switzerland, 2014. (электронная).

28. Булатова И.А. Взаимосвязь цитокинового статуса и процессов неоангиогенеза с тяжестью поражения печени и кишечника / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, Ю.И. Третьякова, Н.И. Насибуллина, К.Н. Карлышева, С.В. Падучева // Новости «Вектор-Бест».- 2014. – Т. 72. - № 2. - С. 8-13.

29. Третьякова Ю.И. Роль полиморфизма генов VEGF (rs2010963) и eNOS (rs1799983) в прогрессировании хронического гепатита С и язвенного колита / Ю.И. Третьякова, В.В. Щёкотов, И.А. Булатова, А.П. Щёктова // Материалы Юбилейной Двадцатой Объединенной Российской Гастроэнтерологической Недели. – Москва, 2014. – Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. - Приложение № 44. - № 5. – Т. 24. - С. 83.

30. Булатова И.А. Цитокины у больных циррозом печени вирусного и невирусного генеза / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, С.В. Падучева, В.В. Щёкотов, Е.В. Жижелев // Новости «Вектор-Бест». - 2015. – Т. 75. - № 1. - С. 2-5.

31. Щёкотов В.В. Фактор некроза опухоли-альфа, васкулоэндотелиальный фактор роста, гиалуроновая кислота и их гены при циррозе печени / В.В. Щёкотов, А.П. Щёктова, И.А. Булатова, А.В. Кривцов, Н.И. Насибуллина, С.В. Падучева // Сборник тезисов. Материалы X национального конгресса терапевтов. – Москва, 2015. – С. 187.

32. Щёктова А.П. Диагностика стадии фиброза печени у больных хроническим гепатитом С по концентрации гиалуроновой кислоты / А.П. Щёктова, И.А. Булатова, В.В. Щёкотов // Материалы XIX Международной научной конференции «Здоровье нации – XXI век». – Светлогорск, 2015. – С. 256-258.

33. Булатова И.А. Роль фактора некроза опухоли альфа и полиморфизма гена TNF в локусе G4682A в прогрессировании хронического гепатита С / И.А. Булатова, А.П. Щёктова, В.В. Щёкотов, А.В. Кривцов, Н.И. Насибуллина // Новости «Вектор-Бест».- 2015. – Т. 77. - № 3. - С. 5-10.

Монографии

34. Щёктова А.П., Щёкотов В.В., Булатова И.А. Эндотелиальная дисфункция и фиброз печени // Монография. LAP LAMBERT Academic Publishing (2012-11-02).- 184с. ISBN 9783659300691.

Приоритетные справки

1. Щёктова А.П. Способ диагностики стадии фиброза печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С / А.П. Щёктова, И.А.

Булатова, В.В. Щёколов, В.С. Шелудько, Н.И. Насибуллина // № 2015-121-005 от 20.06.2015.

2. Щёколова А.П. Способ диагностики стадии фиброза печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С / А.П. Щёколова, И.А. Булатова, В.В. Щёколов, В.С. Шелудько, Н.И. Насибуллина // № 2015-139-205 от 14.09.2015.

Методические рекомендации

1. Неинвазивная диагностика фиброза печени: методические рекомендации / Сост. И.А. Булатова, А.П. Щёколова, В.В. Щёколов, В.С. Шелудько – Пермь: ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, 2016.- 15 с.

2. Неинвазивная диагностика фиброза печени: методические рекомендации / Сост. И.А. Булатова, А.П. Щёколова, В.В. Щёколов, В.С. Шелудько – Пермь: Минздрав Пермского края, 2016.- 15 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АОС – антиоксидантная система

АСТ - аспаратаминотрансфераза

АФП – альфа-фетопропротеин

АЦП – алкогольный цирроз печени

ВЭФР – васкулоэндотелиальный фактор роста

ГГТП - гамма-глутамилтранспептидаза

ГК – гиалуриновая кислота

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ГЛП – глутатион-пероксидаза

ИЛ-6 – интерлейкин-6

ИЛ-28В – интерлейкин-28В

ИФА – иммуноферментный анализ

МДА – малоновый диальдегид

ОЖСС – общая железосвязывающая способность сыворотки

ОНП – однонуклеотидный полиморфизм

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СРФ – скорость развития фиброза

УЗЭ – ультразвуковая эластография

ФНО- α – фактор некроза опухоли-альфа

ФП – фиброз печени

ХГ – хронический гепатит

ХГС – хронический гепатит С

ХЗП – хронические заболевания печени

ХС – холестерин

НСV - hepatitis C virus

НОМА-IR – Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance

Подписано в печать 23.03.2016 г. Тираж 100 экз.
Формат 60x90/16. Усл. печ. л. 2. Заказ №

Отпечатано в издательско-полиграфическом комплексе «ОТ и ДО»
614094, г. Пермь, ул. Овчинникова, 19
тел./факс (342) 224-47-47