



УДК 616.36-004-008.847.9-076-053.6:613.25

СЫВОРОТОЧНЫЕ БИОМАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ ФИБРОГЕНЕЗА ПЕЧЕНИ У ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ

Л.К. ПАРХОМЕНКО
Л.А. СТРАШОК
Е.В. БУЗНИЦКАЯ

*Харьковская медицинская академия
последипломного образования,
Украина*

e-mail: parkhomenko.lk@mail.ru

В статье приведены данные о методах неинвазивной диагностики фиброзных изменений на фоне неалкогольной жировой болезни печени у подростков с ожирением. Установлено, что метод определения уровня коллагена IV типа, фибронектина, N-терминальных пропептидов и C-терминальных телопептидов коллагена I типа обладает высокой чувствительностью в отношении диагностики фиброгенеза печени.

Ключевые слова: дети, подростки, неалкогольная жировая болезнь печени, фиброгенез печени, ожирение, методы диагностики.

Введение. В современной гепатологии известно много факторов, влияние которых приводит к развитию хронических диффузных заболеваний печени [12, 15]. Это вирусы, алкоголь, лекарственные соединения, токсины, аутоиммунные реакции, генетически обусловленные метаболические нарушения и другие. В настоящее время неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является одним из самых распространенных хронических заболеваний печени в мире, которая объединяет спектр клинико-морфологических изменений, представленных стеатозом, стеатогепатитом, стеатофиброзом и циррозом печени [3, 4, 8, 10]. В основе патогенеза жировой болезни печени лежит феномен инсулинорезистентности (ИР) и гиперинсулинемия [13, 14]. НАЖБП встречается у большинства людей с ожирением, основным путем прогрессирования которой является процесс фиброгенеза, который сопровождается откладыванием компонентов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) (коллаген разных типов, ламинин, фибронектин и др.) в перисинусоидальных пространствах, что приводит к структурной и функциональной недостаточности органа. Реальную частоту распространенности заболевания установить сложно, в связи с недостаточным использованием неинвазивных скрининговых методов диагностики, благодаря которым можно обнаружить начальные формы заболевания [1, 11]. Согласно данным последних научных исследований, морфологические и биохимические маркеры фиброгенеза при НАЖБП выявляются уже на этапе стеатоза, хотя накопление жировых включений гепатоцитами может длительно продолжаться как фоновое состояние [9]. Это приводит к торможению процессов регенерации и замещению гепатоцитов избыточным количеством составляющих ЭЦМ, которые синтезируются звездчатыми клетками печени. Одним из компонентов ЭЦМ является фибронектин. Этот гликопротеин способствует фиксации клеток в межклеточном пространстве за счет взаимодействия с мембранными рецепторами, также связывается с проколлагеновыми фибриллами, усиливает процессы фагоцитоза, то есть является «молекулярным клеем» [7]. При прогрессировании процесса фиброгенеза изменяется как количественный, так и качественный состав ЭЦМ, в частности повышается уровень коллагена разных типов. Одним из первых при разнообразных повреждениях печени синтезируется коллаген IV типа, который является основным структурным элементом базальных мембран клеток. Уровень коллагена IV типа отображает текущие гепатоцеллюлярные повреждения на начальных этапах и процессы регенерации лобулярной структуры печени [6, 7]. В дальнейшем происходит аккумуляция в ЭЦМ фибриллярных типов коллагена, в частности I типа, который участвует в формировании мостовидного фиброза и, в конечном результате, способствует развитию цирроза. Диагностическими критериями фиброгенеза при этом выступают N-терминальные пропептиды коллагена I типа, а фибролизиса – C-терминальные телопептиды коллагена I типа [1, 6].

До настоящего времени наиболее информативным и объективным методом диагностики НАЖБП остается пункционная биопсия печени, которая позволяет провести оценку стадии, исключить другие причины поражения печени и прогнозировать последующий ход заболевания [2, 5, 6]. Но в силу существенных ограничений, а именно: получение малоинформативного материала, так называемые «ошибки попадания», риск осложнений, детский возраст, сложности в последующем динамическом наблюдении, возникают основания для разработки неинвазивных, более безопасных и чувствительных методов диагностики, преимущественно биохимических и молекулярных, которые высоко коррелируют с показателями биопсии печени и максимально доступны в клинической практике [2, 7, 16].



Цель. Изучить диагностическую значимость сывороточных биомаркеров фиброгенеза печени у подростков с ожирением.

Материалы и методы. На базе отделения эндокринологии ГУ „Институт охраны здоровья детей и подростков НАМН” г. Харькова (Украина) было обследовано 226 больных с экзогенно-конституциональным ожирением в возрасте 8–18 лет: 129 юношей ((57,08±3,29)%), 97 девушек ((42,92±3,29)%). Контрольную группу составили 30 здоровых детей того же возраста. Для оценки функционального состояния печени у подростков с ожирением использовали комплекс клинико-лабораторных, биохимических и инструментальных методов исследования. Критерием инсулинорезистентности служила гомеостатическая модель НОМА–IR (Homeostasis model assessment).

Методом иммуноферментного анализа определяли в сыворотке крови биохимические маркеры интенсивности фиброгенеза печени, а именно, фибронектин, коллаген IV типа, N-терминальные пропептиды и C-терминальные телопептиды коллагена I типа. Фибронектин в плазме определяли с помощью набора реагентов Fibronectin ELISA Kit (ЗАО «Биохиммак», РФ); коллаген IV типа – Serum collagen IV EIA («Argutus Medical», Япония); N-терминальные пропептиды коллагена I типа – NT-proCNP («Biomedica», Австрия); C-терминальные телопептиды коллагена I типа – Serum CrossLaps Elisa («Immunodiagnostic Systems Ltd», Великая Британия). Референтные значения для коллагена IV типа – (99,0±2,3) мкг/л в сыворотке крови; фибронектина – (70,0±14,0) мкг/мл в плазме крови. Концентрация N-терминальных пропептидов и C-терминальных телопептидов коллагена I типа в сыворотке крови колеблется в зависимости от возраста и пола (табл. 1). Наличие отмеченных маркеров в сыворотке и плазме крови обследованных лиц выше максимально допустимого уровня свидетельствовало о фиброгенезе печени.

Таблица 1

Референтные уровни N-терминальных пропептидов и C-терминальных телопептидов коллагена I типа в сыворотке крови

Биомаркер	препубертатный период		ранний пубертатный период		собственно пубертатный период	
	Мальчики	Девочки	Юноши	Девушки	Юноши	Девушки
N-терминальные пропептиды, пмоль/л	4,52±0,324	5,87±0,334	6,1±0,274	4,98±0,268	4,9±0,352	3,75±0,147
C-терминальные телопептиды, нг/мл	1,883±0,374	2,029±0,361	2,281±0,474	2,266±0,368	1,069±0,552	0,821±0,447

Для оценки структурно-функционального состояния печени проводили ультразвуковое исследование по общепринятой методике на аппарате “SLE-101 PC” MEDELCOM.

Этические нормы на всех этапах обследования были соблюдены. Работа была проведена с учетом требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986 г.), директивы Совета Европейского экономического общества по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.), закона Украины «Про лікарські засоби» (1996 г., ст. 7, 8, 12), положений ICH GCP (2008 г.), GLP (2002 г.). Исследования не вызывали психологического дискомфорта у больных. Пациентам и их родителям была предоставлена информация о методах и объеме исследования, подписано информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическая обработка информационного массива проводилась с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel и SPSS Statistics 17.0. Для оценки достоверности отличий использовался t-критерий Стьюдента (p), наличия взаимосвязей – корреляционный анализ. Критический уровень значимости для проверки статистических гипотез при сравнении групп принимался равным 0,05.

Результаты и их обсуждение. Наличие ИР по уровню индекса НОМА–IR было установлено у 113 ((50,0±3,33)%) больных ожирением.

Исследование показателей ЭЦМ печени и фиброгенеза (табл. 2) обнаружило достоверное повышение уровней коллагена IV типа и фибронектина у подростков с ожирением (p<0,05). Показатели фибронектина крови достоверно отличались по группам в зависимости от наличия ИР, что по-видимому свидетельствует о более тяжелом поражении печени у подростков с ИР (p<0,05).



Таблица 2

**Уровни коллагена IV типа и фибронектина у подростков с ожирением
в зависимости от наличия ИР (M±σ)**

Группы больных	n	Коллаген IV типа, мкг/л	Фибронектин, мкг/мл
ИР +	113	107,61±7,04*	115,86±7,20* **
ИР –	113	103,76±8,31*	93,00±6,31*
Группа контроля	30	85,91±2,38	78,36±2,12

Примечание: * достоверность отличий по сравнению с контролем; ** между группами с ИР и без ИР (p<0,05).

В качестве диагностических критериев двух физиологически разнонаправленных процессов – фиброгенеза и фибролизиса, определяли уровни N-терминальных пропептидов и C-терминальных телопептидов коллагена I типа соответственно, с последующей оценкой преобладания одного из них. Результаты содержания N-терминальных пропептидов коллагена I типа сыворотки крови представлены в табл. 3, из которой видно, что уровень последних достоверно превышает референтные значения у всех подростков с ожирением, в отличие от детей контрольной группы (p<0,05).

Таблица 3

**Показатели N–терминальных пропептидов коллагена I типа у подростков с ожирением
в зависимости от наличия ИР (M±σ)**

Группы больных	N-терминальные пропептиды коллагена I типа, пмоль/л					
	препубертатный период (n=32)		ранний пубертатный период (n=92)		собственно пубертатный период (n=102)	
	Мальчики	Девочки	Юноши	Девушки	Юноши	Девушки
ИР + (n=113)	9,03±0,21* **	11,12±1,60* **	8,6±1,04*	7,42±0,76*	8,28±0,80* **	5,51±0,88* **
ИР – (n=113)	6,98±0,65*	5,9±0,77*	9,536±1,84*	6,903±0,61*	7,806±0,94*	4,536±0,52*
Группа контроля (n=30)	4,45±0,13	5,64±0,14	6,21±0,16	4,81±0,12	5,08±0,13	3,79±0,11

Примечание: * достоверность отличий по сравнению с контролем; ** между группами с ИР и без ИР (p<0,05).

Нужно отметить, что у подростков с ИР показатели N–терминальных пропептидов коллагена I типа были более повышены, чем в группе обследованных без ИР, что свидетельствует о более интенсивном процессе фиброгенеза печени на фоне ИР (p<0,05). В препубертатном периоде данный маркер фиброгенеза был достоверно более высок у девочек с ИР, в отличие от мальчиков (p<0,05), а в собственно пубертатном периоде – наоборот юноши с ИР имели более высокие значения N–терминальных пропептидов, чем девушки (p<0,05). В группе детей без ИР уровни биомаркера у юношей раннего пубертатного и собственно пубертатного возраста достоверно значимо превышали показатели среди девушек аналогичного возраста (p<0,05). То есть, можно утверждать о наличии начальных этапов фиброгенеза печени у подростков больных ожирением, более выраженные у обследованных с ИР.

Результаты исследования показателей фибролизиса (C–терминальных телопептидов коллагена I типа) представлены в табл. 4.

Как видно из полученных данных, уровни C-терминальных телопептидов коллагена I типа у подростков с ожирением были в пределах референтных норм и статистически значимо не отличались от таких в группе контроля (p>0,05). Исключением являются дети раннего пубертатного возраста как с ИР, так и без нее, у которых показатели маркера фибролизиса были достоверно ниже, чем у детей группы контроля (p<0,05). По-видимому, это связано с преобладанием процессов фиброгенеза над фибролизисом, что характерно для фиброза печени. Достоверной разницы между обследованными с ИР и без нее установлено не было (p>0,05), хотя тенденция к преобладанию уровней исследуемого маркера отмечалась у подростков с ИР.



Таблица 4

Показатели С-терминальных телопептидов коллагена I типа у подростков с ожирением в зависимости от наличия ИР (M±σ)

Группы больных	С-терминальные телопептиды коллагена I типа, нг/мл					
	препубертатный период (n=32)		ранний пубертатный период (n=92)		собственно пубертатный период (n=102)	
	Мальчики	Девочки	Юноши	Девушки	Юноши	Девушки
ИР + (n=113)	1,86±0,41	1,921±0,14	1,88±0,18*	1,673±0,18*	1,291±0,08	1,134±0,14
ИР – (n=113)	1,72±0,25	1,927±0,42	1,888±0,34*	1,281±0,10*	1,218±0,13	0,733±0,06
Группа контроля (n=30)	1,52±0,32	1,89±0,43	2,61±0,71	2,47±0,68	1,23±0,25	0,89±0,19

Примечание: * достоверность отличий по сравнению с контролем (p<0,05).

По результатам корреляционного анализа у подростков с ИР была установлена прямая взаимосвязь средней силы между уровнем N-терминальных пропептидов и С-терминальных телопептидов коллагена I типа (r=0,461; p<0,01). Таким образом, при преобладании процессов фиброгенеза автоматически активируется система фибролизиса для поддержания физиологического равновесия обмена соединительной ткани. У обследованных без ИР была также установлена прямая корреляционная взаимосвязь средней силы между содержанием пропептидов и телопептидов коллагена I типа (r=0,452; p<0,001); сильная корреляционная взаимосвязь между уровнями коллагена IV типа и С-терминальных телопептидов (r=0,709; p<0,05) и средней силы с уровнем N-терминальных пропептидов коллагена I типа (r=0,467; p<0,05). Это свидетельствует о том, что у подростков с ожирением функциональная активность этих разнонаправленных систем находится в напряженном состоянии, что без адекватного терапевтического вмешательства может привести к развитию необратимых изменений в печени.

При ультразвуковом исследовании печени было установлено, что у (24,8±3,5)% детей с ожирением размеры печени были увеличены, у (13,0±2,7)% обследованных – резко увеличены, причем статистически значимо чаще у подростков с ИР ((31,8±5,0)% – увеличены, (17,6±4,1)% – резко увеличены), в отличие от детей без ИР ((16,2±4,4)% – увеличены, (7,4±3,1)% – резко увеличены), (p<0,05). Снижение экзогенности печени было установлено у (13,2±4,1)% лиц без ИР, а у подростков с ИР в (24,7±4,6)% случаев отмечалось снижение и в (9,4±3,1)% – повышение экзогенности, что свидетельствует о неблагоприятной динамике развития стеатогепатоза (p<0,05). При проведении корреляционного анализа у обследованных с ИР отмечалась обратная корреляционная взаимосвязь средней силы между увеличением размеров печени и содержанием тел- и пропептидов коллагена I типа (r=-0,406; p<0,05 и r=-0,316; p<0,05, соответственно).

Выводы. Полученные результаты исследования показателей фиброгенеза печени в сыворотке крови у подростков с ожирением свидетельствуют о достоверном повышении уровней коллагена IV типа и фибронектина, в отличие от детей контрольной группы (p<0,05). Показатели фибронектина крови достоверно отличались по группам в зависимости от наличия ИР, что связано с более тяжелым поражением печени у детей с ИР (p<0,05).

Установленные изменения уровней N-терминальных пропептидов и С-терминальных телопептидов коллагена I типа свидетельствуют о преобладании процессов фиброгенеза над процессами фибролизиса у подростков с ожирением, что в последующем может привести к формированию фиброза печени.

По данным УЗИ у подростков с ожирением имели место четкие признаки стеатогепатоза (увеличение размеров печени, снижение экзогенности), более выраженные у лиц с ИР (p<0,05), которые коррелировали с уровнем тело – и пропептидов коллагена I типа.

Таким образом, неинвазивные методы диагностики с использованием сывороточных биомаркеров фиброза печени (коллагена IV типа, фибронектина, N-терминальных пропептидов и С-терминальных телопептидов коллагена I типа) подтвердили свою диагностическую ценность в установлении наличия процессов фиброгенеза печени на ранних стадиях формирования у подростков с ожирением.

В перспективе, это позволит объективно отбирать больных для проведения биопсии печени, динамического наблюдения за пациентом с контролем биохимических показателей фиброза печени и разработки антифиброзной терапии.



Литература

1. Араблинский, А.В. К вопросу о неинвазивной диагностике жирового гепатоза при неалкогольном стеатогепатите [Текст] / А.В. Араблинский, М.Х. Чеченов // Медицинская визуализация. – 2008. – № 1. – С. 46–51.
2. Бабак, О.Я. Сывороточные биомаркеры и фибротесты в диагностике фиброза печени: недостатки и перспективы [Текст] / О.Я. Бабак, Н.А. Кравченко // Сучасна гастроентерологія. – 2012. – № 3 (65). – С. 71–80.
3. Белоусов, Ю.В. Жировой гепатоз у детей: дефиниция и диагноз [Текст] / Ю.В. Белоусов, Е.Н. Баджанян // Современная педиатрия. – 2010. – № 5 (33). – С. 107–109.
4. Вовк, Е.И. Жировая болезнь печени в практике терапевта: место в сосудистом континууме [Текст] / Е.И. Вовк // Лечащий врач. – 2009. – № 8. – С. 78–81.
5. Мехтиев, С.Н. Неалкогольная жировая болезнь печени: клиника, диагностика и лечение [Текст] / С.Н. Мехтиев, В.Б. Гриневич, Ю.А. Кравчук // Лечащий врач. – 2008. – № 2. – С. 19–22.
6. Пархоменко, Л.К. Вопросы диагностики неалкогольной жировой болезни печени в подростковом возрасте [Текст] / Л.К. Пархоменко, Л.А. Страшок, Е.В. Бузницкая // Здоровье ребенка. – 2011. – № 7 (34). – С. 107–112.
7. Пирогова, И.Ю. Диагностика фиброза печени: инвазивные и неинвазивные методы [Текст] / И.Ю. Пирогова, С.А. Пышкин // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 3. – С. 10–15.
8. Урсова, Н.И. Жировая дистрофия печени при метаболическом синдроме в практике врача-педиатра [Текст] / Н.И. Урсова // Лечащий врач. – 2010. – № 1. – С. 37–40.
9. Хухлина, О.С. Особенности патоморфологических и метаболических параметров фиброза печени у больных с алкогольной и неалкогольной жировой болезнью печени [Текст] / О.С. Хухлина // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 5 (25). – С. 34–40.
10. Чернявский, В.В. Жировая болезнь печени как интегральная проблема внутренней медицины [Текст] / В.В. Чернявский // Новости медицины и фармации. – 2011. – № 4 (354). – С. 64–67.
11. Чорбинская, С.А. Метаболический синдром и неалкогольная жировая болезнь печени [Текст] / С.А. Чорбинская, Е.В. Борисенко, Н.А. Кравцова // Врач. – 2009. – № 3. – С. 26–28.
12. Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease [Text] / P. Angulo // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol. 346. P. 1221–1231.
13. Feldstein, A.E. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease in children: a follow-up study for up to 20 years [Text] / A.E. Feldstein, P. Charatcharoenwitthaya, S. Treeprasertsuk // Gut. – 2009. – 58. – 1538–1544.
14. Kistler, K.D. Symptoms and Quality of Life in Obese Children and Adolescents with Non-alcoholic Fatty Liver Disease [Text] / K.D. Kistler, J. Molleston, A. Unalp // Alimentary Pharmacology and Therapeutics. – 2010. – 31 (3). – 396–406.
15. Kotronen, A. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome [Text] / A. Kotronen, H. Yki-Jarvinen // Arterioscler. Thromb. Vas. Biol. – 2008. – Vol. 28 (1). – P. 27–38.
16. Sanai, F.M. Liver biopsy for histological assessment: the case against [Text] / F.M. Sanai, E.B. Keeffe // Saudi J. Gastroenterol. – 2010. Vol. 16 (2). – P. 124–132.

THE SERUM MARKERS OF LIVER FIBROGENESIS IN ADOLESCENTS WITH OBESITY

L.K. PARKHOMENKO
L.A. STRASHOK
E.V. BUZNYTSKA

*Kharkiv National Academy
of Postgraduate Education,
Ukraine*

e-mail: parkhomenko.lk@mail.ru

The article presents data about methods of non-invasive diagnostics of the fibrotic alterations of non-alcoholic fatty liver disease in pediatric patients with obesity. It has been established that determination of collagen type IV, fibronectin, N-terminal propeptides and C-terminal telopeptides of collagen type I had a high sensitivity as regards the diagnosis of liver fibrosis.

Key words: children, adolescents, non-alcoholic fatty liver disease, liver fibrosis, obesity, diagnostics methods.