На правах рукописи

КУЛЕБИНА ЕЛЕНА АНАТОЛЬЕВНА

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ФИБРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ

14.01.08 – Педиатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук
Сурков Андрей Николаевич

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, заведующая отделом гастроэнтерологии, главный научный сотрудник Обособленного структурного подразделения «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю. Е. Вельтищева» федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Волынец Галина Васильевна

кандидат медицинских наук, заведующая отделением гастроэнтерологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы»
Скворцова Тамара Андреевна

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи

Защита диссертации состоится «____» _____2021 г. в _____часов на заседании диссертационного совета Д 001.023.01 при ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России по адресу 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России по адресу 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр. 1 и на сайте http://www.nczd.ru/
Автореферат разослан «____» _____2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор РАН **Винярская Ирина Валериевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Фиброз печени (ФП), несмотря на очевидность своего существования, таит в себе множество нерешенных вопросов. Так, окончательно не изучены патогенетические механизмы фиброобразования, отсутствуют точные методы неинвазивной диагностики различных стадий ФП, малоизвестны эффекты препаратов с потенциальным антифибротическим действием (Schuppan D., 2018). Особенно остро эта проблема стоит в педиатрии, так как ряд болезней печени дебютирует с рождения или в раннем детском возрасте и быстро прогрессирует с развитием выраженных структурно-функциональных изменений органа (Сурков А.Н., 2016).

ФП рассматривают как патологический процесс замещения некротизированных гепатоцитов избыточным количеством белков экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), являющийся результатом хронического персистирующего воздействия на ткань печени различных повреждающих факторов (вирусы, аутоантитела, промежуточные продукты обмена веществ, токсины, лекарственные препараты) (Daniels S.J., 2019). Конечная стадия фиброза – цирроз печени (ЦП), сопровождающийся различными осложнениями (кровотечения из варикозно расширенных вен пищевода и желудка, асцит, печеночная энцефалопатия, коагулопатия, гепатоцеллюлярная карцинома), создающими угрозу для жизни пациента.

Несмотря на бурное развитие медицинской науки в последние годы и разработку все новых методов лабораторной и инструментальной диагностики структурных изменений печени (Caussy C., 2019), главенствующую позицию в плане окончательной идентификации стадии ФП все же продолжает прочно удерживать биопсия с морфологическим исследованием полученного образца ткани и последующим расчетом гистологического индекса склероза с использованием различных полуколичественных шкал (Knodell, Ishak, Desmet, METAVIR) (Teufel-Schäfer U., 2021). Однако риск возникновения осложнений делает эту инвазивную процедуру потенциально опасной, поэтому уже давно существует потребность в поиске альтернативных путей диагностики ФП (Zhu B., 2017).

В связи с этим начало XXI столетия было ознаменовано стартом инновационных исследований различных аспектов, связанных с дебютом, прогрессированием и обратным развитием ФП, а также разработкой лекарственных препаратов, обладающих подавляющим действием на патологический фиброгенез (Hwang J. Y., 2018). Одним из научных направлений стало изучение основных структурных компонентов соединительной ткани, таких как коллагены различных типов, в частности I, III, IV (К-I, К-III, К-IV), гиалуроновая кислота (ГК) и другие, которые активно участвуют в формировании ЭЦМ (Gudowska M., 2016).

Степень разработанности темы исследования

Еще в 1980 г. Voss B. с соавт. показали, что в нормальной печени К-I и К-III присутствуют в стенках кровеносных сосудов и желчных протоков портальных трактов, а в паренхиме располагаются вдоль синусоид. К-IV образуется только в соединительной ткани портальных трактов, а также стенках центральных вен и в интактной паренхиме практически не определяется, в то время как в ткани фиброзированной печени последний распределен аналогично типам I и III (Voss B., 1980).

Базальные мембраны – одни из основных компонентов структурного «скелета» эпителия, эндотелия, мышечных, жировых, шванновских клеток и аксонов. Функции их многочисленны: они модулируют клеточное поведение, регулируют органогенез, способствуют репарации тканей, образуют барьер для фильтрации и метастазирования

опухоли, связывают факторы роста и опосредуют ангиогенез. В норме печеночные синусоиды не имеют базальной мембраны, но при патологии в пространстве Диссе ламинин и К-IV самоорганизуются в две независимые супрамолекулярные сети, которые связываясь с нидогеном и перлеканом, образуют морфологически различимую базальную мембрану. Одновременно синусоидальный эндотелий теряет свои фенестры и трансформируется в эндотелий сосудистого типа, приводя к капилляризации печеночных синусоид, что служит гистохимическим маркером тяжести поражения печени, выраженного прогрессирования патологии и нарушения функций органа (Mak K.M., 2017).

Таким образом, полученные результаты дали основание предполагать, что К-I, К-III и К-IV, ламинин, а также ГК могут рассматриваться в качестве неинвазивных биомаркеров фиброза при алкогольной болезни печени, вирусном гепатите и неалкогольной жировой болезни печени (Nishikawa H., 2016).

Многочисленные исследования показали, что транзиентная эластография (ТЭ) способна помочь в диагностике стадии ФП у детей при хронических болезнях печени (ХБП) (Pokorska-Spiewak M., 2021; Rowland M., 2020). При этом значения плотности для дифференциации стадий фиброза отличаются в каждом исследовании (Hwang J.Y., 2018). Следует учесть, что в большинстве работ описаны показатели плотности печени при хронических вирусных гепатитах у взрослых (Geng Z., 2019), а данные о возможностях ТЭ для диагностики стадии фиброза при ХБП в детской популяции остаются ограниченными (Jacqueline A., 2017). В то же время научные работы, посвященные фиброзированию печени при наследственных заболеваниях, аутоиммунных поражениях, особенно в педиатрии, единичны, а их данные противоречивы по причине малых выборок пациентов, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Цель исследования

Оценка диагностических возможностей прямых сывороточных биомаркеров фиброзирования и транзиентной эластографии для идентификации различных стадий фиброза при хронических болезнях печени у детей.

Задачи исследования

1. Определить характер клинико-лабораторных, инструментальных и морфологических изменений у детей с хроническими болезнями печени в зависимости от стадии фиброза.
2. Установить диагностические характеристики транзиентной эластографии для дифференциации различных стадий фиброза у детей с хроническими болезнями печени.
3. Определить сывороточное и тканевое содержание прямых биомаркеров фиброгенеза (коллагенов I, III, IV типов, гиалуроновая кислота) и установить параллелизм их изменений в зависимости от стадии фиброза печени.
4. Разработать диагностические модели для интерпретации стадийности фиброза печени у детей с помощью прямых биомаркеров фиброгенеза.
5. Оптимизировать алгоритм диагностики и динамического мониторинга фиброза печени при хронических формах ее патологии у детей.

Научная новизна

Впервые в Российской Федерации (РФ) у детей в сыворотке крови одновременно оценены четыре прямых биомаркера фиброзирования в определенном сочетании – коллагены трех типов и гиалуроновая кислота.

Впервые в Российской Федерации у детей проведен анализ двух методик неинвазивной диагностики структурных изменений печени с оценкой информативности каждого из них.

Впервые в РФ у детей рассчитана пропорциональная площадь коллагенов как основных составляющих экстрацеллюлярного матрикса в ткани печени в зависимости от гистологической стадии фиброза, оцененной по шкале METAVIR.

Впервые в РФ у детей показан параллелизм изменений сывороточной концентрации коллагена IV типа и его содержания в ткани печени.

Впервые в РФ разработаны прогностические модели с использованием прямых биомаркеров фиброгенеза, а также значений транзиентной эластографии для диагностики начальной стадии фиброза и риска наличия цирроза у детей с хроническими болезнями печени.

Теоретическая и практическая значимость

В результате исследования определены основные клинико-лабораторные, инструментальные и морфологические изменения у детей с хроническими болезнями печени в зависимости от стадии фиброза. Установлены оптимальные значения показателей транзиентной эластографии для диагностики стадии фиброза при хронической патологии печени у детей. Валидированы величины сывороточных концентраций коллагенов различных типов и гиалуроновой кислоты для верификации стадии фибротических изменений печени. Полученные значения сывороточного содержания прямых биомаркеров фиброгенеза позволили разработать диагностические модели для интерпретации стадийности фиброза. Показана высокая диагностическая эффективность разработанных моделей в диагностике начальной стадии фиброза (F1 по METAVIR), а также в определении риска наличия цирроза печени (F4 по METAVIR). Оптимизирован алгоритм диагностики и динамического мониторинга фиброза печени при хронических формах ее патологии у детей.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты работы внедрены в клиническую практику гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой Научно-исследовательского института педиатрии имени Г.Н. Сперанского (далее – НИИ педиатрии им. Г.Н. Сперанского) федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее – ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России), а также в педагогический процесс кафедры педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Методология и методы исследования

При выполнении работы был осуществлен тщательных анализ современных научных литературных данных по вопросу изучения диагностической значимости сывороточных маркеров фиброзирования в диагностике стадии фиброза печени. Особое внимание уделено изучению зависимости сывороточной и тканевой концентраций основных компонентов экстрацеллюлярного матрикса. В диссертационном исследовании были оценены данные 278 детей с хроническими болезнями печени различной этиологии, каждому из которых была проведена биопсия печени с морфологической верификацией стадии фиброза. Оценку медицинской документации проводили за период 8 лет, с учетом клинико-лабораторных и инструментальных показателей пациентов. Анализ полученных данных осуществляли

в соответствии с современными методиками, включающими описательные статистики, оценку статистической значимости, ROC-анализ, корреляционный анализ, для построения уравнения прогнозирования риска развития изучаемой патологии в зависимости от полученных показателей были использованы дискриминантный анализ и бинарная логистическая регрессия.

Положения, выносимые на защиту

1. Морфологическая стадия фиброза ассоциируется с изменениями клинико-лабораторных и инструментальных показателей, отражающих степень выраженности синдромов гиперспленизма и портальной гипертензии, а также признаки нарушения функционального состояния печени. Выявленная положительная корреляция стадии фиброза, оцененная по шкале METAVIR, со степенью гистологической активности по шкале Knodell указывает на то, что интенсивность воспалительного процесса в печени приводит к усилению фибротических изменений.

2. Транзиентная эластография – достаточно точный неинвазивный метод диагностики различных стадий фиброза при хронических болезнях печени у детей.

3. Прямые биомаркеры фиброзирования – коллагены I и IV типов, гиалуроновая кислота – обладают высокой диагностической значимостью в градации стадий фиброза печени, что имеет большое значение для практической медицины и, в особенности, для педиатрии, поскольку взятие крови несопоставимо по степени инвазивности с биопсией.

4. Пропорциональная площадь коллагена IV типа при выраженном фиброзе (F3) и циррозе печени (F4) составляет более 50% от общей площади ткани органа, что отражает основной состав волокон экстрацеллюлярного матрикса на стадии формирования цирроза при хроническом поражении печени у детей. Повышенная сывороточная концентрация коллагена IV типа коррелирует с пропорциональной его площадью в ткани печени, отражая динамику процесса фиброзирования.

5. Неинвазивные биомаркеры и использование их сочетаний могут помочь в принятии клинических решений и устранить необходимость в повторной процедуре инвазивной биопсии: разработанные прогностические модели позволяют диагностировать начальную стадию фиброза (F1 по шкале METAVIR) и определять риск наличия цирроза исходя из значений концентраций коллагена I типа и гиалуроновой кислоты. В общий план обследования детей с хронической патологией печени целесообразно включать определение сывороточных концентраций коллагенов I и IV типов, гиалуроновой кислоты, а также проведение транзиентной эластографии.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается выбором релевантного дизайна исследования, репрезентативной выборкой пациентов, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными. Подготовка, анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на Юбилейном XXV Конгрессе детских гастроэнтерологов России и стран СНГ «Актуальные вопросы абдоминальной патологии у детей» (г. Москва, 14 марта 2018 г.); XXI Конгрессе педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (г. Москва, 16 февраля 2019 г.); Конференции «Актуальные вопросы гастроэнтерологии и диетологии в педиатрии и детской хирургии» (г. Грозный, 21 марта 2019 г.); IV

International Congress Pediatrics 2.0 (г. Москва, 6 сентября 2019 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Осенние Филатовские чтения - важные вопросы детского здоровья" (г. Пенза, 27 сентября 2019 г.); Научно-практических конференциях студентов и молодых ученых «Студеникинские чтения-2019» (г. Москва, 2 декабря 2019 г.) и «Студеникинские чтения-2020» (г. Москва, 2 декабря 2020 г.); Вебинаре для практикующих врачей «Возможности неинвазивной диагностики фиброза при хронических болезнях печени у детей», Pediatrics school (г. Москва, 16 марта 2021 г.).

Публикации

По теме диссертации всего опубликовано 12 научных работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных научных результатов диссертационных исследований – 8 (из них статей в журналах, индексируемых в Scopus – 2), тезисов – 3, монографий – 1.

Личный вклад автора

Вклад автора состоит в непосредственном активном участии в исследовательской работе на всех этапах: как в анализе литературы, постановке цели и задач, разработке методических подходов и их выполнения, ведении пациентов в стационаре, так и при обработке медицинской документации, формировании базы данных, проведении исследований, статистической обработке, анализе полученных результатов, на основании которых были сформулированы основные положения диссертационного исследования, выводы и практические рекомендации.

Объем и структура диссертации

Общий объем работы составляет 144 страницы машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 4 глав собственных наблюдений, главы обсуждения результатов, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 21 таблицей, 36 рисунками и 3 клиническими примерами. Список использованной литературы включает 141 источник: 13 отечественных и 128 зарубежных.

Этическая экспертиза

Исследование было одобрено на совместном заседании ученого совета и этического комитета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, протокол №7 от 12.11.2018 г.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объем и методы исследования

Работа выполнена в гастроэнтерологическом отделении с гепатологической группой (заведующий отделением – д.м.н. А.Н. Сурков), хирургическом отделении с неотложной и плановой помощью (заведующий отделением – д.м.н. Е.Ю. Дьяконова), лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии лабораторного отдела (и.о. заведующего отделением – к.м.н. Н.М. Алябьева) и патологоанатомическом отделении (заведующий отделением – К.А. Куликов) НИИ педиатрии им. Г.Н.Сперанского ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (директор - заслуженный врач Российской Федерации, д.м.н., профессор А.П. Фисенко).

Согласно дизайну, в исследование включено 295 детей (Рисунок 1).

В I группу (ретроспективная часть исследования) включено 135 пациентов, госпитализированных в гастроэнтерологическое отделение с гепатологической группой НИИ педиатрии им. Г.Н. Сперанского ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в период с 2012 по 2018 гг. в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 мес с ХБП различной этиологии.

Во II группу (проспективная часть исследования) включено 143 пациента от 5 до 17 лет 11 мес с ХБП, госпитализированных в гастроэнтерологическое отделение с гепатологической группой НИИ педиатрии им. Г.Н. Сперанского ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России за период 2018-2020 гг.

Контрольная группа составила 17 условно здоровых детей, проходивших обследование в Консультативно-диагностическом центре ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в 2021 г.

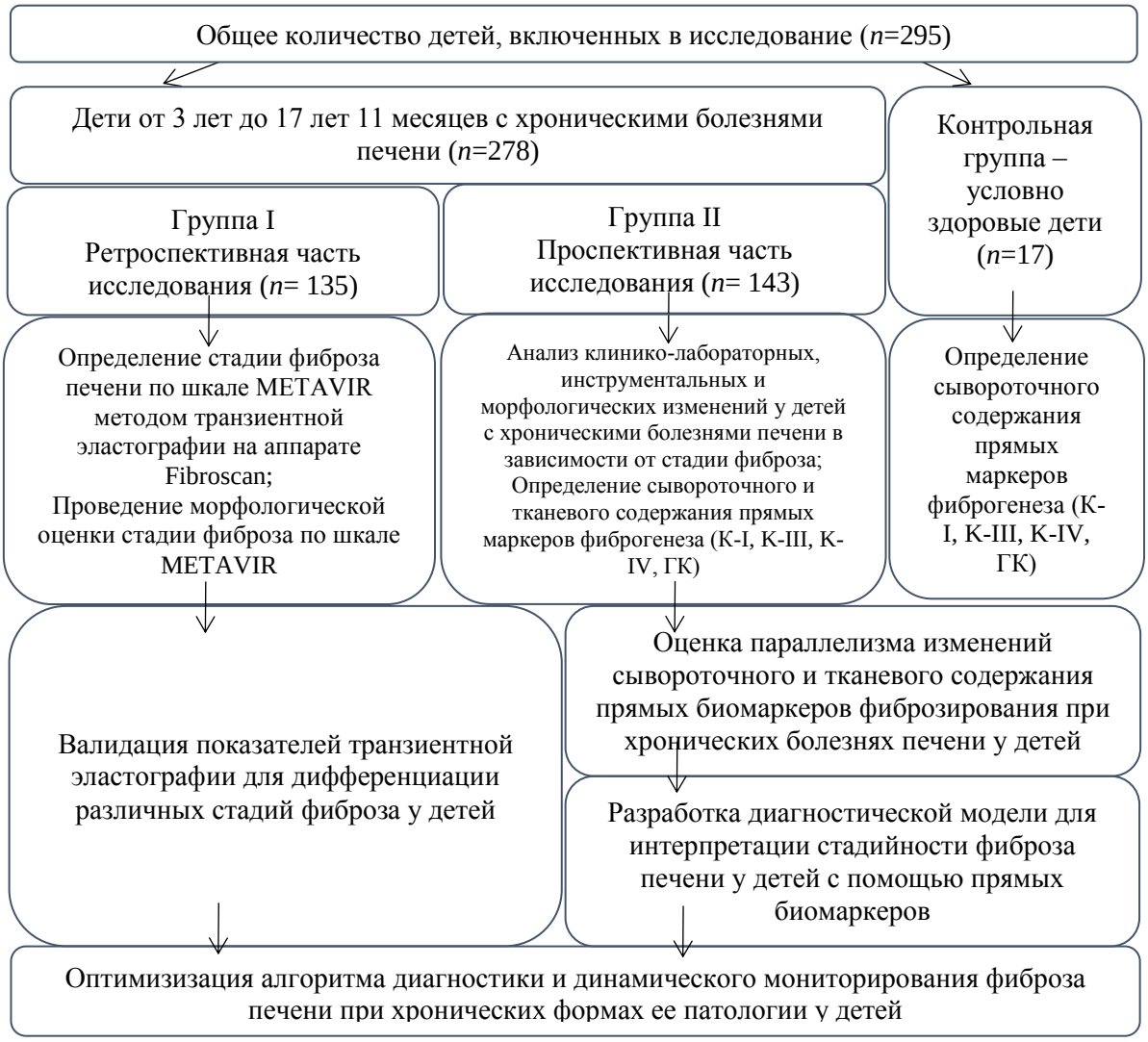


Рисунок 1 - Дизайн исследования: ретроспективно-проспективное нерандомизированное неконтролируемое исследование

Всем детям, включенным в ретроспективную часть исследования, было проведено измерение плотности печени методом ТЭ на аппарате FibroScan® 502 (Echosence, Франция). Различные датчики применяли в зависимости от окружности грудной клетки: S1 (с частотой 5 МГц) при окружности грудной клетки менее 45 см, S2 с аналогичным значением частоты при окружности более 45, но менее 75 см, M (с частотой 3,5 МГц) – при окружности грудной клетки более 75 см. Глубина измерений при режиме S1 – 15-40 мм от края кожи, S2 – 20-50 мм, M – 25-65 мм. Площадь исследуемого участка в режиме S1 составляла 2 см2, S2 – 2,4 см2, M – 3 см2. Процедуру ТЭ проводили натощак, пациент лежа на спине максимально отводил кзади правую руку, исследователь устанавливал датчик в шестом межреберье по правой

передней подмышечной линии (проекция VII сегмента печени), в пятом межреберье по правой среднеключичной линии (проекция VIII сегмента), в девятом и десятом межреберьях по правой среднеключичной линии (проекция VI сегмента), по срединной линии в эпигастральной области (проекция II, III сегментов), в седьмом и восьмом межреберьях по правой среднеключичной линии (проекция V сегмента), в пятом межреберье по правой парастернальной линии (проекция IV сегмента). Плотность печени была рассчитана аппаратом автоматически как медиана 10 успешных измерений с межквартильным диапазоном менее 30% от медианного значения.

Всем пациентам, включенным в проспективную часть исследования, выполняли краевую резекцию ткани печени под общим эндотрахеальным наркозом под лапароскопическим контролем на базе хирургического отделения с неотложной и плановой помощью. Далее полученный биоптат обрабатывали по стандартной методике и заливали в парафиновые блоки, из которых с помощью микротома получали серийные ультратонкие срезы. Для дифференцировки структур ткани срезы окрашивали гематоксилином и эозином, для выявления соединительной ткани – пикрофуксином по методу Ван–Гизона. При морфологическом исследовании биоптата определяли стадию фиброза в соответствии со шкалой METAVIR. Стадию фиброза оценивал слепым методом один патолог.

Затем парафиновые срезы образцов ткани печени толщиной 5 мкм монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизином. Для определения экспрессии белков применяли антитела к К-I, К-III и К-IV. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 20 минут в 3% перекиси водорода. Иммуногистохимические реакции проводили с помощью пероксидазополимерной системы визуализации по стандартному протоколу RE 7150-К «Novocastra» – модифицированный peroxidase-antiperoxidase (PAP) – метод. Демаскировку антител осуществляли путем кипячения срезов при 100ºС в миниавтоклаве Pascal в цитратном буфере с pH=6,0 в течение 10 минут. Пероксидазу проявляли 3-3- диаминобензидином из набора протокола.

Площадь отложения коллагена в микроморфологическом препарате оценивали с помощью микроскопа Nikon (Nikon Corporation, Япония) с цветной цифровой CMOS-камерой DS-Ri2, используя программное обеспечение Nikon elements BR и методику подсчета ППК.

У пациентов в день выполнения биопсии печени натощак проводили взятие венозной крови из локтевой или подкожной вены запястья с помощью системы однократного применения BD Vacutainer Safety-Lok (Becton, Dickinson and Company, США) в количестве 3−5 мл, для сбора образцов использовали одноразовые стерильные вакуумные пробирки BD Vacutainer SST II Advance с активатором свертывания и разделительным гелем для сыворотки (Becton, Dickinson and Company, США). Собранные образцы центрифугировали в течение 20 мин при 1000g, после чего аликвотировали в микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл и замораживали при температуре –70°С. Повторные циклы замораживания/оттаивания не допускались. Содержание К-I, К-III, К-IV и ГК в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа на медицинском микропланшетном ридере Sunrise (TECAN, Австрия) с использованием специальных наборов реагентов: «Collagen Type I» (Cloud-Clone Corp.), «Collagen Type III» (Cloud-Clone Corp.), «Collagen Type IV» (Cloud-Clone Corp.), «Hyaluronic Acid» (Corgenix, Inc.).

Указанные наборы реагентов предназначены для иммуноферментного анализа «сэндвич»-методом с целью количественного измерения К-I, К-III, К-IV и ГК в сыворотке крови человека in vitro.

В использованных тест-системах нормальные значения концентраций изучаемых биомаркеров указаны не были, в связи с чем за референсные значения были приняты 95% доверительные интервалы, рассчитанные для каждого показателя у контрольной группы, которую составили 17 здоровых детей (Таблица 1).

Таблица 1 – Референсные значения сывороточных концентраций изучаемых прямых биомаркеров фиброзирования у детей контрольной группы (*n*=17)

Показатель	Референсные значения, нг/мл
К-I	175,2-311,9
К-III	0,12-2,10
К-IV	0,82-3,76
ГК	17,5-19,9

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладной программы «IBM SPSS Statistics 21» (StatSoft Inc. США). Для иллюстрации распределения измерения плотности печени по 4-м стадиям METAVIR, а также для отображения показателя при отсутствии фиброза использовали диаграмму размаха (диаграмма «ящик с усами»). Для анализа вида распределений применяли критерии Шапиро-Уилка и Лиллиефорса. Дисперсии распределений признаков оценивали с помощью F-критерия в процедуре дисперсионного анализа ANOVA. Поскольку распределение уровня исследованных показателей не было нормальным, а групповые дисперсии не были равны, различия между группами определяли с помощью непараметрического теста Краскела-Уоллиса, а при обнаружении статистически значимых различий проводили парные сравнения с применением непараметрического теста Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$. Результаты исследований представлены в виде медианы параметра, интерквартильного отрезка Me [Q1; Q3] (25-й и 75-й перцентили) и диапазон значений (min; max). Анализ взаимосвязи (корреляции) двух количественных признаков осуществляли непараметрическим методом ранговой корреляции Спирмена (ρ). Функциональную взаимосвязь при коэффициенте корреляции менее 0,5 расценивали как слабую, 0,5-0,7 – среднюю, более 0,7 – сильную. Результаты качественных признаков выражены в абсолютных числах с указанием долей (%). Для построения уравнения прогнозирования риска развития изучаемой патологии в зависимости от полученных показателей были использованы дискриминантный анализ и бинарная логистическая регрессия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Возрастная, гендерная и нозологическая характеристика обследованных пациентов

В ретроспективную часть исследования (группа I) было включено 135 пациентов, из них 39% мальчиков (*n*=53) и 61% девочек (*n*=82). Медиана возраста на момент обследования составила 10,1 лет [9,6; 16 лет]. Минимальный возраст – 3 года, максимальный – 17 лет. Распределение пациентов по нозологическим формам: дети с аутоиммунным гепатитом (АИГ) – 50 (37%); первичный склерозирующий холангит (ПСХ) – 15 (11,1%) детей; болезнь Вильсона (БВ) – у 36 (26,7%); хронический вирусный гепатит С (ХГС) и хронический вирусный гепатит В (ХГВ) – 34 (25,2%).

В проспективную часть исследования (II группа) было включено 143 ребенка с ХБП в возрасте от 5 до 17 лет 11 мес. Среди детей 42% составили мальчики (*n*=60),

58% - девочки (*n*=83). Медиана возраста на момент обследования составила 14 лет [10; 17 лет]. Распределение пациентов по нозологическим формам: преобладали дети с АИГ – 56 (39%); АИГ в сочетании с первичным склерозирующим холангитом (АИГ+ПСХ) имел место у 32 (22%) пациентов; ПСХ был диагностирован у 25 (18%) детей; АИГ в сочетании с аутоиммунной холангиопатией (АИГ+АИХ) – у 14 (10%); первичным билиарным холангитом (ПБХ) и аутоиммунным холангитом (АИХ) страдали – по 6 детей (4%) соответственно; АИГ в сочетании с первичным билиарным холангитом (АИГ+ПБХ) был верифицирован у 4 детей (3%).

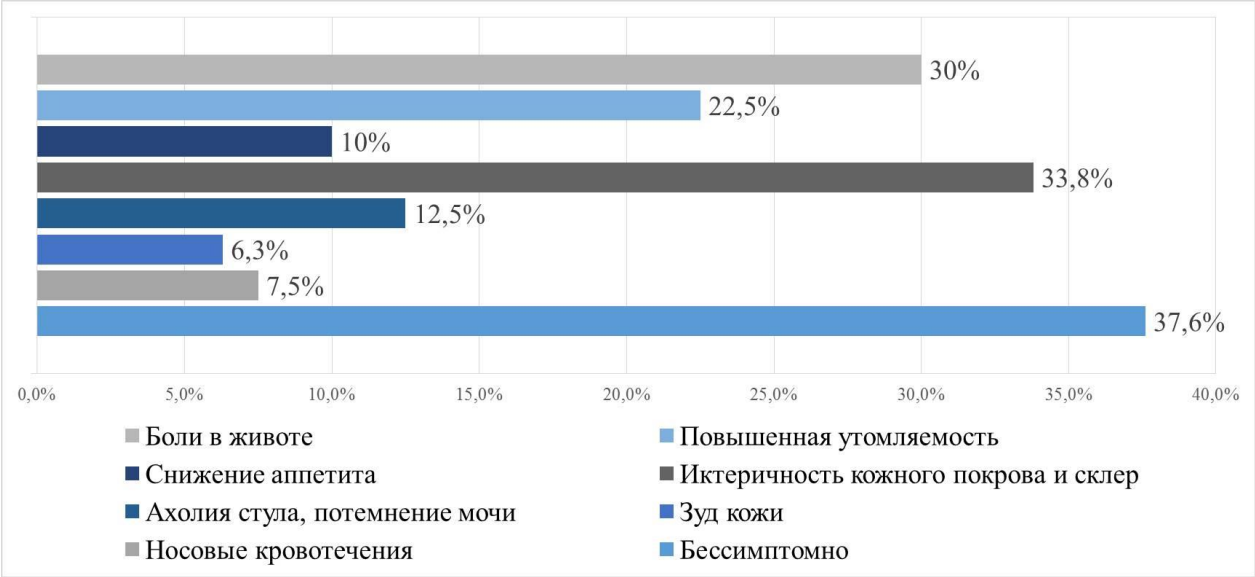


Рисунок 2 – Основные причины обследования детей группы II в дебюте ХБП (*n*=143)

Среди причин обращения за медицинской помощью у детей в дебюте ХБП (в большинстве случаев наблюдались множественные жалобы у одного пациента) были выявлены следующие: боли в животе, повышенная утомляемость, отсутствие или снижение аппетита, иктеричность кожи и склер, ахолия стула и потемнение мочи, зуд кожи, носовые кровотечения, бессимптомное начало (диагностика путем плановой оценки биохимического анализа крови по месту жительства либо обнаружение гепатоспленомегалии при плановом физикальном осмотре педиатра по месту жительства), процентное распределение представлено на Рисунке 2.

Клинико-лабораторные и инструментальные изменения при хронических болезнях печени у детей в зависимости от стадии фиброза и степени гистологической активности

При анализе данных лабораторного обследования пациентов установлено, что стадия фиброза по данным морфологического исследования ассоциируется с изменениями клинико-лабораторных и инструментальных показателей, отражающих степень выраженности синдромов гиперспленизма (увеличение пальпаторных размеров селезенки, снижение количества тромбоцитов) и портальной гипертензии (увеличение ультразвуковых размеров селезенки, диаметра воротной вены), а также признаки нарушения белково-синтетической функции печени (снижение сывороточных концентраций альбумина, протромбинового индекса (ПТИ), что подтверждается по данным корреляционного анализа (Таблица 2).

Выявленная положительная корреляция стадии фиброза со степенью гистологической активности по шкале Knodell указывает на то, что интенсивность воспалительного процесса в печени приводит к усилению фибротических изменений.

Таблица 2 – Взаимосвязи клинико-лабораторных, инструментальных и морфологических показателей со стадией ФП по шкале METAVIR у детей группы II (*n*=143)

Показатель	Спленомегалия при пальпации	Тромбоциты, 10^9/л	Спленомегалия по данным УЗИ	Расширение диаметра воротной вены по УЗИ	Альбумин г/л	ПТИ, %	Индекс гистологической активности по шкале Knodell, баллы
METAVIR по биопсии	ρ=0,510, ***p*<0,001**	ρ=-0,526, ***p*<0,001**	ρ=0,560, ***p*<0,001**	ρ=0,371, ***p*<0,001**	ρ=-0,292, ***p*=0,005**	ρ=-0,311, ***p*=0,009**	ρ=0,370, ***p*<0,001**

Показатели транзиентной эластографии в зависимости от стадии фиброза печени у обследованных детей

У обследованных пациентов преобладала стадия ЦП (F4 по METAVIR) – 53 (39%) ребенка; выраженный ФП был диагностирован у 12 (9%) детей, умеренный – у 24 (18)% и минимальный – у 15 (11%); у 31 (23%) ребенка формирования фиброза диагностировано не было.

Нами были рассчитаны медианы и интерквартильный отрезок для плотности печени, определяемой с помощью ТЭ, в зависимости от гистологической стадии фиброза, определяемой по шкале METAVIR (Таблица 3).

Таблица 3 – Показатели ТЭ с указанием интерквартильного отрезка, минимальных и максимальных значений у обследованных пациентов группы I (*n*=135) в зависимости от морфологической стадии фиброза по шкале METAVIR

METAVIR	Медиана	[Интерквартильный отрезок]	Min	Max
0	4,2	[3,8; 5,0]	2,7	5,9
1	6,1	[5,9; 6,8]	5,0	9,1
2	7,95	[6,1; 8,75]	5,1	10,6
3	10,15	[8,9; 10,8]	7,6	12,5
4	21,6	[13,2; 34,9]	8,3	69,2

Распределение пациентов с различными стадиями ФП в зависимости от нозологической формы ХБП представлено на Рисунке 3.

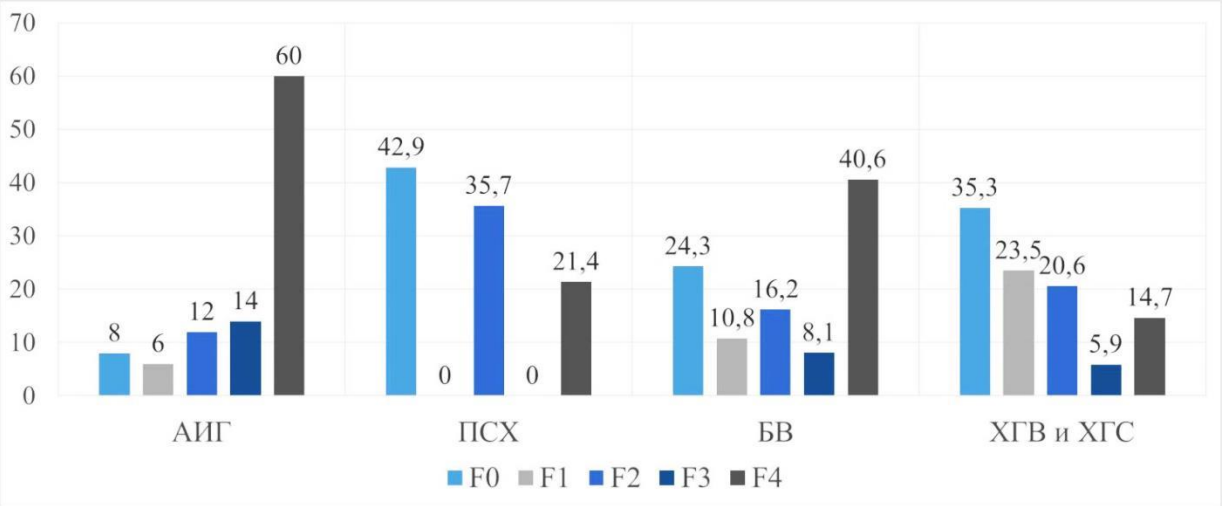


Рисунок 3 – Распределение стадий ФП у детей группы I (*n*=135) с разными нозологическими формами ХБП. Значения представлены в виде %

ROC-анализ показателей плотности печени для оценки стадии фиброза методом транзиентной эластографии

При оценке методом ROC-анализа оптимальные значения для диагностики слабого (F1) и умеренного (F2) фиброза составили >5,8 кПа и >7,8 кПа, для выраженного фиброза (F3) и цирроза (F4) >9,4 кПа и >12,7 кПа, соответственно, с AUROC 0,943 [0,909-0,976], 0,928 [0,888-0,968], 0,975 [0,952-0,999] и 0,942 [0,891-0,992], соответственно. Чувствительность составила 87,5% и 81,7%, 95,7% и 78,2%, специфичность - 96,2% и 96,3%, 93,7% и 100%, соответственно (Таблица 4).

Таблица 4 – Оптимальные значения транзиентной эластографии для диагностики фиброза при хронических болезнях печени у детей группы I (*n*=135)

METAVIR	Cut-off, кПа	AUC	Se, %	Sp, %
F0	-	-	-	-
F1	5,8	0,943	87,5	96,2
F2	7,8	0,928	81,7	96,3
F3	9,4	0,975	95,7	93,7
F4	12,7	0,942	78,2	100

Примечание. AUC – площадь под ROC-кривой, Se – чувствительность, Sp – специфичность.

Особенности изменений сывороточных концентраций прямых биомаркеров фиброзирования при хронических болезнях печени у детей

В зависимости от гистологической стадии ФП, оцененной по шкале METAVIR, пациенты группы II распределились следующим образом: стадию F1 имели 27 (18,9%) обследованных, стадию F2 – 37 (25,9 %) пациентов, стадию F3 – 36 (25,2%), стадию F4 – 43 (30%) ребенка.

Результаты иммуноферментного анализа образцов сывороток пациентов позволили выявить определенные изменения концентраций исследуемых биомаркеров в сыворотке крови при различных стадиях ФП (Таблица 5).

Таблица 5 – Концентрации К-I, -III, -IV и ГК в сыворотке крови у детей группы II (*n*=143) при различных стадиях ФП

Биомаркер	**Стадия фиброза по шкале METAVIR**				$p_{К-У}$
	F1 (n=27)	*F2 (n=37)*	*F3 (n=36)*	*F4 (n=43)*	
К-I (нг/мл)	149,0 [83,9; 238,0]	109,5 [56,2; 151,9]	113,4 [83,2; 156,7]	87,1 [45,2; 108,0]	**0,007**
К-III (нг/мл)	1,65 [0,34; 3,9]	1,42 [0,16; 2,79]	1,27 [0,23; 2,63]	1,1 [0,44; 3,37]	0,559
К-IV (нг/мл)	7,8 [1,92; 18,2]	17,3 [11,7; 26,4]	18,2 [6,3; 32,9]	30,2 [15,3; 90,6]	**<0,001**
ГК (нг/мл)	26,9 [21,9; 33,5]	28,9 [25,7; 37,1]	37,4 [29,20; 51,1]	94,7 [40,75; 173,0]	**<0,001**

Примечание. $p_{К-У}$ – уровень статистической значимости согласно критерию Краскела-Уоллиса.

Как видно из данных, представленных в Таблице 6, согласно критерию Краскела-Уоллиса, отмечались статистически значимые различия сывороточных концентраций К-I, К-IV и ГК при разных стадиях ФП у детей (p=0,007, p<0,001и p<0,001, соответственно. При этом, концентрации значимо не различались в зависимости от нозологической формы заболевания (p>0,05).

Дальнейшие попарные сравнения с применением критерия Манна-Уитни позволили выявить, что концентрация К-I в сыворотке крови была статистически значимо выше у пациентов со стадией процесса F1 и F3, чем со стадией F4 (p=0,003 и p=0,004, соответственно). Статистически значимых различий в концентрациях этого показателя между стадиями F1 и F2 (p=0,098), F1 и F3 (p=0,239), F2 и F3 (p=0,440), F2 и F4 (p=0,060) выявлено не было.

Концентрация К-IV была статистически значимо выше на стадиях F2, F3 и F4, чем на стадии F1 (p=0,002, p=0,007 и p<0,001, соответственно), а также на стадии F2, чем на стадии F4 (p=0,002), и на стадии F3, чем при F4 (p=0,007), при этом статистически значимых различий в его содержании на стадиях F2 и F3 (p=0,926), не получено. Сывороточный уровень ГК был статистически значимо выше на стадии F3, чем на стадии F1 и F2 (p<0,001 и 0,011, соответственно), а также на стадии F4, чем на стадиях F1, F2 и F3 (p<0,001, p<0,001 и p<0,001, соответственно). Статистически значимых различий не получено только на стадиях F1 и F2 (p=0,060).

Ниже представлен фрагмент корреляционной матрицы (Таблица 6), который доказывает наличие определенных связей между содержанием исследуемых биомаркеров в сыворотке крови и выраженностью структурных изменений печени по данным морфологического исследования гепатобиоптатов.

Так, были установлены следующие взаимосвязи значений шкалы METAVIR: слабая обратная с концентрацией К-I (ρ= –0,242, p=0,005), средние прямые с уровнями К-IV (ρ=0,409, p<0,001) и ГК (ρ=0,597, p<0,001). Кроме того, выявлена слабая прямая взаимосвязь между сывороточным содержанием К-IV и ГК (ρ=0,265, p=0,023). Таким образом, чем более выражен ФП, тем содержание в сыворотке крови К-IV и ГК выше, а К-I, наоборот, ниже.

Таблица 6 – Взаимосвязи гистологического индекса склероза с сывороточной концентрацией прямых биомаркеров фиброзирования

Выраженность ФП	**Биомаркеры**			
	К-I	*К-III*	*К-IV*	*ГК*
METAVIR	**ρ= –0,242** ***p*=0,005**	ρ= –0,12 *p*=0,883	**ρ=0,409** ***p<0,001***	**ρ=0,597** ***p<0,001***

Выявленные изменения могут указывать на особенности фиброзирования печени у детей при хронической прогрессирующей патологии, а именно на изменение количественного состава ЭЦМ, формирующего соединительную ткань, за счет уменьшения содержания нормальных его компонентов (К-I) и избыточного отложения патологических (К-IV, ГК).

На следующем этапе исследования нами с помощью проведенного ROC-анализа были вычислены оптимальные разделяющие значения сывороточных концентраций К-I, -IV и ГК, позволяющие классифицировать пациентов по степени выраженности ФП, обладающие наилучшим сочетанием чувствительности и специфичности.

Площадь под ROC-кривой, соответствующая взаимосвязи сывороточной концентрации К-I со стадией ФП, для диагностики минимального ФП (F1 по METAVIR), составила 0,655±0,075 с 95% ДИ: 0,507-0,802. Полученная модель была статистически значимой (p=0,021). Пороговое значение К-I в точке cut-off равно 123,5 нг/мл. При концентрации исследуемого биомаркера в сыворотке крови равном этому значению и выше, можно прогнозировать риск наличия F1, но не F2-F4. Чувствительность и специфичность метода составили 60,9% и 68,7% соответственно.

Площадь под ROC-кривой, соответствующая взаимосвязи концентрации К-IV со стадией ФП, составила для разграничения незначительного (F1) и умеренного (F2) ФП – 0,807±0,092 с 95% ДИ: 0,627-0,987. Полученная модель была статистически значимой (p=0,011). Пороговое значение К-IV в точке cut-off равно 11,29 нг/мл. При концентрации исследуемого биомаркера в сыворотке крови равном или превышающем данное значение можно прогнозировать F2, но не F1. Чувствительность и специфичность метода составили 82,4% и 66,7%, соответственно.

Площадь под ROC-кривой, соответствующая взаимосвязи концентрации К-IV со стадией ФП, составила для разграничения не ЦП (F1-F3) и ЦП (F4) – 0,685±0,062 с 95% ДИ: 0,567-0,810. Полученная модель была статистически значимой (p=0,007). Пороговое значение К-IV в точке cut-off равно 27,40 нг/мл. При концентрации исследуемого биомаркера в сыворотке крови равном или превышающем данное значение можно прогнозировать F4, но не F1-F3. Чувствительность и специфичность метода составили 61,15% и 64,7%, соответственно.

Площадь под ROC-кривой, соответствующая взаимосвязи концентрации ГК со стадией ФП, составила для разграничения незначительного ФП (F1) и ЦП (F4) – 0,912±0,050 с 95% ДИ: 0,815-1,00. Полученная модель была статистически значимой (p<0,001). Пороговое значение ГК в точке cut-off равно 34,90 нг/мл. При концентрации исследуемого биомаркера в сыворотке крови равном или превышающем данное значение можно прогнозировать риск F4, но не F1. Чувствительность и специфичность метода составили 84,6% и 77,8%, соответственно.

Площадь под ROC-кривой, соответствующая взаимосвязи концентрации ГК со стадией ФП, составила для разграничения умеренного ФП (F2) и ЦП (F4) – 0,849±0,064 с 95% ДИ: 0,723-0,974. Полученная модель была статистически значимой (p<0,001). Пороговое значение ГК в точке cut-off равно 36,50 нг/мл. При концентрации исследуемого биомаркера в сыворотке крови равном или превышающем данное

значение можно прогнозировать риск F4, но не F2. Чувствительность и специфичность метода составили 84,6% и 61,5%, соответственно.

Площадь под ROC-кривой, соответствующая взаимосвязи концентрации ГК со стадией ФП, составила для разграничения стадий выраженного ФП (F3) и ЦП (F4) – 0,780±0,064 с 95% ДИ: 0,655-0,905. Полученная модель была статистически значимой (p=0,001). Пороговое значение ГК в точке cut-off равно 38,30 нг/мл. При концентрации исследуемого биомаркера в сыворотке крови равном или превышающем данное значение можно прогнозировать риск F4, но не F3. Чувствительность и специфичность метода составили 84,6% и 60,7%, соответственно.

Площадь под ROC-кривой, соответствующая взаимосвязи концентрации ГК со стадией ФП, составила для разграничения не ЦП (F1-F3) и ЦП (F4) – 0,825±0,048 с 95% ДИ: 0,730-0,920. Полученная модель была статистически значимой (p<0,001). Пороговое значение ГК в точке cut-off равно 38,30 нг/мл. При концентрации исследуемого биомаркера в сыворотке крови равном или превышающем данное значение прогнозировался риск F4, но не F1-F3. Чувствительность и специфичность метода составили 84,6% и 70,6%, соответственно.

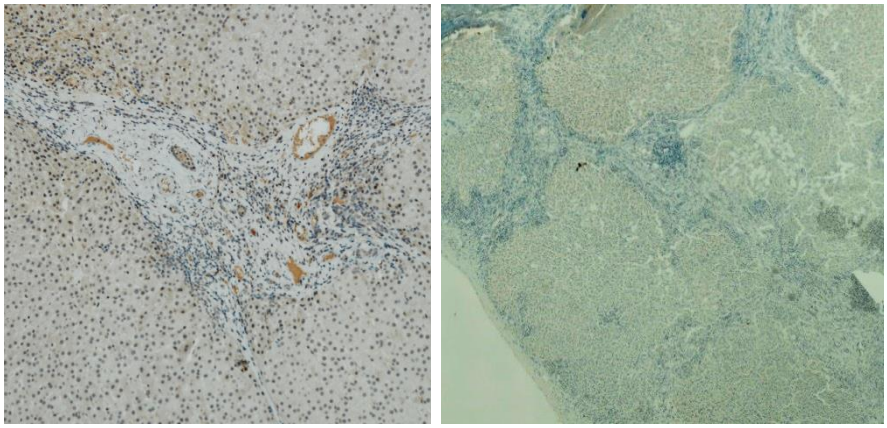
Характеристика отложения коллагенов различных типов в ткани печени в зависимости от стадии фиброза

На следующем этапе нами было оценено содержание коллагенов различных типов – К-I, К-III, К-IV в ткани печени методом подсчета пропорциональной площади у 61 пациента с ХБП, включенных в группу II (проспективная часть исследования). Распределение обследованных пациентов по стадиям ФП представлено в Таблице 7.

Таблица 7 – Распределение обследованных пациентов по стадиям фиброза по шкале METAVIR (n=61)

METAVIR, стадия	**Количество пациентов, абс.**	**Количество пациентов, отн. (%)**
0	0	0
1	5	8,2
2	17	27,9
3	20	32,8
4	19	31,1
Итого	**61**	**100**

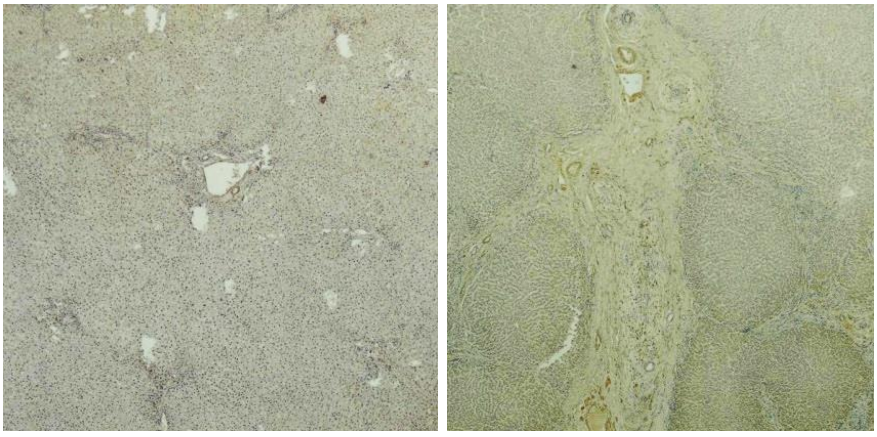
При иммуногистохимическом окрашивании биоптатов на К-I при минимальной стадии ФП (F1 по METAVIR) было выявлено отложение данного типа коллагена в стенках кровеносных сосудов и желчных протоков портальных трактов, а также вдоль синусоидов (Рисунок 4А), и ввиду разрозненного отложения оценка пропорциональной его площади оказалась невозможна. На стадиях F2-F4 К-I в ткани печени методом иммуногистохимического окрашивания не определялся (Рисунок 4Б). Это может быть обсуловлено тем, что К-I, составляющий основу соединительнотканного матрикса здоровой печени, замещается патологическими формами коллагена при хронической патологии органа.



А **Б**

Рисунок 4А-Б – Особенности отложения К-I в ткани печени: А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата на К-I, минимальная стадия ФП (F1), увеличение 10х; Б – иммуногистохимическое окрашивание биоптата на К-I, ЦП (F4), увеличение 4х.

Отложение К-III типа было равномерным на всех стадиях ФП, и отмечалось в портальных трактах, стенках центральных вен и синусоидах (Рисунок 5А-Б). Пропорциональная площадь его отложения на всех стадиях составила в среднем 5,3% [2,8; 6,2], статистически значимых различий в зависимости от стадии ФП получено не было (p=0,786).



А **Б**

Рисунок 5А-Б – Особенности отложения К-III в ткани печени: А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата на К-III, умеренный ФП (F2), увеличение 4х; Б – иммуногистохимическое окрашивание биоптата на К-III, ЦП (F4), увеличение 4х

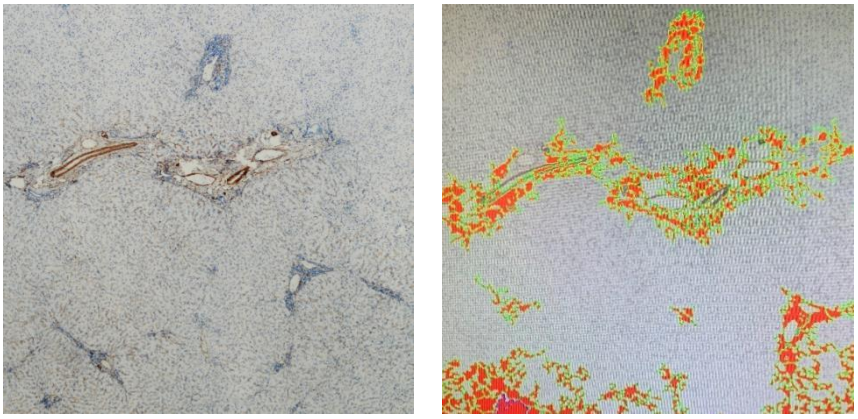
Медиана пропорциональной площади К-IV при слабом ФП (F1 по METAVIR), выраженная в процентах от общей площади ткани печени, равной 3521709,75 нм^2, составила 14,6 [14,33; 17,02], в случае умеренного ФП (F2) медиана составила 19,26 [17,09; 25,14], для выраженного ФП (F3) значение равно 36,92 [31,87; 44,01], при ЦП (F4) медиана – 45,93 [40,66; 51,90], $p_{К\text{-}У}$=0,009 (Таблица 8).

Таблица 8 – Пропорциональная площадь К-IV у детей группы II (*n*=61) при различных стадиях ФП, выраженная в % от общей площади ткани печени

Биомаркер	Стадия фиброза по шкале METAVIR				$p_{К-У}$
	F1 (n=5)	*F2 (n=17)*	*F3 (n=20)*	*F4 (n=19)*	
К-IV (%)	14,6 [14,33; 17,02] min 14,05 max 19,44	19,26 [17,09; 25,14] min 8,35 max 30,58	36,92 [31,87; 44,01] min 20,69 max 47,37	45,93 [40,66; 51,90] min 34,25 max 62,52	**0,009**

Примечание. $p_{К-У}$ – уровень статистической значимости согласно критерию Краскела-Уоллиса.

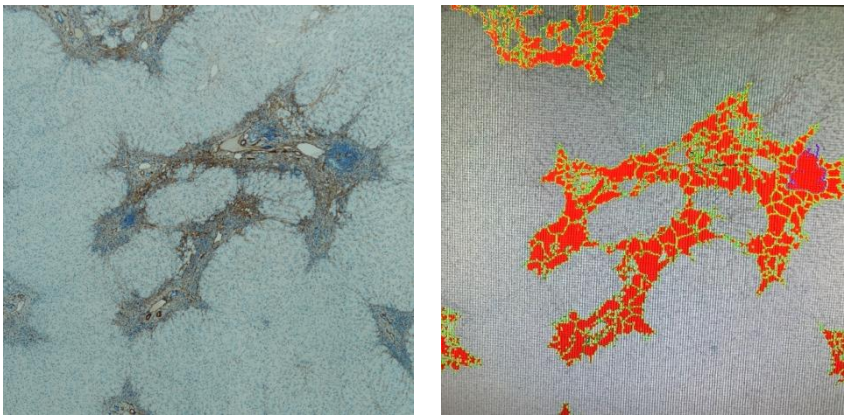
При минимальном ФП (F1 по METAVIR) отложение К-IV наблюдается вдоль портальных трактов (Рисунок 6А-Б).



А **Б**

Рисунок 6А-Б – Особенности отложения К-IV при минимальном ФП (F1 по METAVIR). А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV, увеличение 4х; Б – подсчет площади отложения К-IV по отношению к общей площади ткани печени

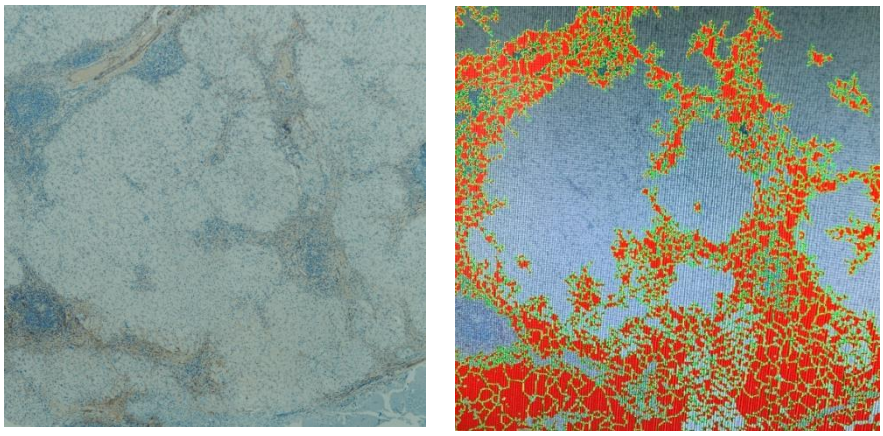
В случае умеренного ФП (F2 по METAVIR) К-IV откладывается в портальных трактах и по ходу порто-портальных септ (Рисунок 7А-Б).



А **Б**

Рисунок 7А-Б – Особенности отложения К-IV при умеренном ФП (F2 по METAVIR). А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV, увеличение 4х; Б – подсчет площади отложения К-IV по отношению к общей площади ткани печени

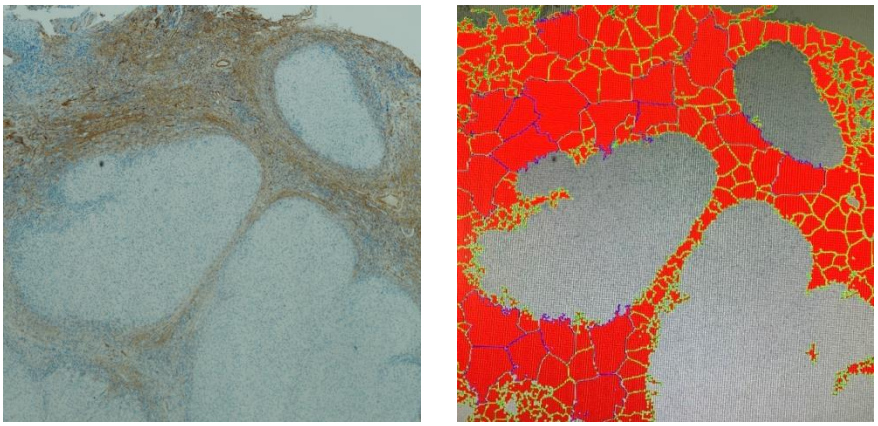
При выраженном ФП (F3) накопление К-IV отмечается вдоль портальных трактов, по ходу множественных формирующихся порто-портальных и портоцентральных септ (Рисунок 8А-Б).



А **Б**

Рисунок 8А-Б – Особенности отложения К-IV при выраженном ФП (F3 по METAVIR). А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV, увеличение 4х; Б – подсчет площади отложения К-IV по отношению к общей площади ткани печени

При сформированном ЦП К-IV составляет значительную площадь ткани печени – более 50%, выстилая полностью сформированные ложные дольки (Рисунок 9А-Б).



А **Б**

Рисунок 9А-Б – Особенности отложения К-IV при ЦП (F4 по METAVIR). А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV, увеличение 4х; Б – подсчет площади отложения К-IV по отношению к общей площади ткани печени

Параллелизм изменений сывороточного и тканевого содержания прямых биомаркеров фиброзирования при хронических болезнях печени у детей

При дальнейшем анализе установлено, что повышенная сывороточная концентрация К-IV положительно коррелирует с пропорциональной его площадью в ткани печени (ρ=0,384, p=0,048), а также с гистологической стадией ФП (ρ=0,525, p=0,005), отражая динамику процесса фиброзирования (Таблица 9).

Таблица 9 – Корреляции сывороточной концентрации К-IV со стадией фиброза по шкале METAVIR и тканевым содержанием К-IV, выраженным в % от общей площади ткани печени и абсолютных значениях (нм^2), *n*=61

Показатель	METAVIR по биопсии	Процент К-IV в ткани	Площадь К-IV, нм^2
К-IV в сыворотке	ρ=0,525 ***p*=0,005**	ρ=0,384 ***p*=0,048**	ρ=0,384 ***p*=0,048**

Возможность прогнозирования развития фиброза и цирроза при хронических поражениях печени у детей с помощью прямых биомаркеров

Следующим этапом исследования было выявление зависимости формирования фибротических изменений печени от содержания прямых биомаркеров в сыворотке крови. С помощью метода дискриминантного анализа нами были разработаны и описаны несколько прогностических моделей. Рассчитаны константы дискриминации, разделяющие исследуемых на две группы. При сравнении средних значений дискриминантной функции в обеих группах с помощью коэффициента λ Уилкса были установлены статистически значимые различия (p<0,001).

Принадлежность пациентов к группе высокого или низкого риска развития события определялась исходя из рассчитанных значений прогностической дискриминантной функции: при значении функции больше рассчитанного показателя пациент относился к группе высокого риска, при значении функции меньше рассчитанного показателя – к группе низкого риска.

Предполагаемые события, исследуемые показатели, константы дискриминантных функций, чувствительность и специфичность разработанных моделей представлены в Таблице 10.

Таблица 10 – Прогностические модели для диагностики начальных стадий ФП и ЦП с использованием значений сывороточных концентраций К-I, ГК и показателей ТЭ

Стадии ФП по шкале METAVIR	Показатели	Коэффициент	Se, %	Sp, %	Уравнение
ЦП (F4)/не ЦП	ГК+ТЭ	0,347	60,9	100	$Y= –1,506+0,006*X_{гк}+0,087*X_{тэ}$
F1/F2-F3	К-I+ТЭ	–0,437	76,7	100	$Y= –4,935+0,006*X_{к-I}+0,501*X_{тэ}$
F1/F2	К-I+ТЭ	–0,247	86,5	100	$Y= –7,749+0,006*X_{к-I}+0,975*X_{тэ}$

Примечание. Y – дискриминантная функция, характеризующая вероятность события, $X_{гк}$ – концентрация ГК в сыворотке крови (нг/мл), $X_{к-I}$ – концентрация К-I в сыворотке крови (нг/мл), $X_{тэ}$ – показатель ТЭ (кПа).

Далее с помощью бинарной логистической регрессии нами была разработана и описана прогностическая модель для определения вероятности развития ЦП (F4), исходя из значений концентраций К-I и ГК в сыворотки крови, а также показателей ТЭ.

Уравнение для этой модели представлено ниже:

$$p = 1 / (1 + 2{,}718^{-Z}) * 100\%$$

$$Z = -14{,}6 – 0{,}018*X_{K\text{-}I} + 0{,}46*X_{ГК} + 1{,}136*X_{ТЭ},$$

где p – вероятность наличия ЦП, $X_{к\text{-}I}$ – концентрация К-I в сыворотке крови (нг/мл), $X_{гк}$ – концентрация ГК в сыворотке крови (нг/мл), $X_{тэ}$ – показатель ТЭ (кПа).

Исходя из значений регрессионных коэффициентов, факторы ГК и ТЭ имеют прямую связь, а фактор К-I – обратную с вероятностью развития ЦП. Уменьшение концентрации К-I на 50 нг/мл увеличивает шансы наличия ЦП в 2,48 раза, увеличение концентрации ГК на 20 нг/мл и увеличение показателя ТЭ на 1 кПа – увеличивает шансы наличия ЦП в 2,51 и 3,11 раза, соответственно.

Полученная регрессионная модель является статистически значимой (p<0,001). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель учитывает 88% факторов, определяющих вероятность развития ЦП.

Чувствительность ее составила 92,5%, специфичность – 96,7%, диагностическая эффективность – 95,4%.

Оптимизация алгоритма диагностики и динамического мониторинга выраженности фиброза печени при хронических формах ее патологии у детей

С учетом полученных нами данных, был оптимизирован алгоритм диагностики и динамического мониторинга фиброза при ХБП в детском возрасте. При обследовании детей с хронической патологией печени целесообразно включать в общий план обследования проведение ТЭ, определение сывороточных концентраций К-I, К-IV и ГК с целью оценки стадии фиброза, в том числе минимальной, и использовать прогностические модели для оценки риска наличия выраженного ФП и ЦП (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Алгоритм диагностики и динамического мониторинга фиброза печени

ВЫВОДЫ

1. Определено, что морфологическая стадия фиброза ассоциируется с изменениями клинико-лабораторных и инструментальных показателей, отражающих степень выраженности синдромов гиперспленизма (снижение количества тромбоцитов (ρ=-0,526, p<0,001), увеличение пальпаторных размеров селезенки (ρ=0,510, p<0,001) и портальной гипертензии (увеличение диаметра воротной вены (ρ=0,371, p<0,001), ультразвуковых размеров селезенки (ρ=0,560, p<0,001), а также признаки нарушения белково-синтетической функции печени (снижение сывороточных концентраций протромбинового индекса (ρ=-0,311, p=0,009), альбумина (ρ=-0,292, p=0,005). Выявленная положительная корреляция стадии фиброза со степенью гистологической активности по шкале Knodell (ρ=0,709, p<0,001) указывает на то, что интенсивность воспалительного процесса в печени приводит к увеличению степени фибротических изменений.

2. Установлено, что определяемые методом транзиентной эластографии значения плотности печени ≥5,8 кПа и ≥7,8 кПа соответствуют минимальному фиброзу (F1) и умеренному фиброзу (F2) с чувствительностью 87,5% и 81,7%, специфичностью – 96,2% и 96,3%, соответственно. Значения плотности печени ≥9,4 кПа и ≥12,7 кПа свидетельствуют о выраженном фиброзе (F3) и циррозе печени (F4) у детей с чувствительностью 95,7% и 78,2%, специфичностью – 93,7% и 100%, соответственно.

3. Доказано участие коллагенов I, IV типов и гиалуроновой кислоты в процессе фиброзирования на основании выявленных взаимосвязей их сывороточных концентраций с морфологической стадией фиброза: слабая обратная с концентрацией коллагена I (ρ= –0,242, p=0,005), средние прямые с уровнями коллагена IV типа (ρ=0,409, p<0,001) и гиалуроновой кислоты (ρ=0,597, p<0,001). Кроме того, выявлена слабая прямая взаимосвязь между сывороточным содержанием коллагена IV и гиалуроновой кислоты (ρ=0,265, p=0,023). Таким образом, чем более выражен фиброз печени, тем содержание в сыворотке крови коллагена IV типа и гиалуроновой кислоты выше, а коллагена I типа, наоборот, ниже.

4. Доказано, что оптимальное значение коллагена I типа для диагностики минимального фиброза печени (F1) составляет 123,5 нг/мл с чувствительностью и специфичностью 60,9% и 68,7% соответственно. Оптимальные значения коллагена IV типа для диагностики умеренного фиброза печени (F2) и цирроза (F4) составляют 11,29 нг/мл с чувствительностью 82,4% и 61,15%, специфичностью 66,7% и 64,7% соответственно. Оптимальные значения гиалуроновой кислоты для диагностики слабого и умеренного фиброза печени составляют 34,9 нг/мл и 36,5 нг/мл, для цирроза — 38,3 нг/мл, чувствительность составила 84,6% на всех стадиях, специфичность — 77,8, 61,5 и 70,6% соответственно.

5. Установлено, что пропорциональная площадь коллагена IV типа при минимальном фиброзе (F1) составляет 14,6%, при умеренном фиброзе (F2) – 19,26%, при выраженном фиброзе (F3) – 36,92%, при циррозе печени (F4) – 45,93% от общей площади ткани печени, что отражает основной состав волокон экстрацеллюлярного матрикса в процессе фиброобразования при хронических формах патологии печени у детей. Повышенная сывороточная концентрация коллагена IV типа положительно коррелирует с пропорциональной его площадью в ткани печени (ρ=0,384, p=0,048), отражая динамику процесса фиброзирования.

6. Разработаны прогностические модели, позволяющие диагностировать вероятность начальной стадии фиброза (F1 по шкале METAVIR) с чувствительностью 86,5% и специфичностью 100%, и прогнозировать риск наличия цирроза (F4) на основе значений сывороточных концентраций коллагена I типа, гиалуроновой кислоты и

значений транзиентной эластографии: уменьшение концентрации коллагена I типа на 50 нг/мл увеличивает шансы ЦП в 2,48 раза, увеличение концентрации гиалурновой кислоты на 20 нг/мл и увеличение показателя транзиентной эластографии на 1 кПа – увеличивает шансы ЦП в 2,51 и 3,11 раза, соответственно. Полученная регрессионная модель является статистически значимой (p<0,001) с чувствительностью 92,5%, специфичностью 96,7% и диагностической эффективностью 95,4%.

7. Разработанный алгоритм наблюдения пациентов позволяет оптимизировать диагностику и динамический мониторинг фиброза при хронических болезнях печени у детей без применения повторной инвазивной биопсии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Транзиентная эластография рекомендуется в качестве доступной неинвазивной информативной и хорошо воспроизводимой методики определения выраженности фибротических изменений при хронических болезнях печени у детей.

В случае невозможности проведения биопсии печени и во избежание повторных пункций при оценке стадии фиброза печени в динамике рекомендовано определение сывороточных концентраций коллагенов I и IV типов, а также гиалуроновой кислоты. Для диагностики начальной стадии фиброза может быть использован сывороточный уровень коллагена I типа; для оценки выраженного фиброза и цирроза – концентрации гиалуроновой кислоты и коллагена IV типа.

Разработанные прогностические модели с применением значений сывороточных концентраций гиалуроновой кислоты, коллагена I типа и показателей транзиентной эластографии рекомендуются для неинвазивной оценки стадии структурных изменений печени при хронических формах ее патологии.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

1. Хроленко П.В., Дьяконова Е.Ю., Сурков А.Н., Гусев А.А., Прудникова Т.А., Бекин А.С., Романова Е.А., Кулебина Е.А., Туманова Е.Л., Куликов К.А., Дворяковский И.В., Русинова Д.С. Современные возможности эндохирургической биопсии у детей с хроническими болезнями печени. Педиатрическая фармакология. 2018; 15(3): 238-248.

2. Кулебина Е.А., Сурков А.Н. Механизмы формирования фиброза печени: современные представления. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2019; 98(6): 166-170.

3. Кулебина Е.А., Сурков А.Н. Прогресс неинвазивной диагностики фиброза печени: обзор современных лабораторных методик. Медицинский совет. 2020; 11: 224-232.

4. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Усольцева О.В. Неинвазивная диагностика фиброза печени: возможности инструментальных методик на современном этапе. Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. 2020; 4(5): 297-301.

5. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Куликов К.А., Потапов А.С., Бессонов Е.Е. Валидация показателей транзиентной эластографии для оценки стадии фиброза печени у детей. Лечащий врач. 2020; 8:57-60.

6. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Фисенко А.П., Потапов А.С., Алябьева Н.М., Зубкова И.В., Жужула А.А. Информативность определения сывороточных

концентраций прямых биомаркёров при диагностике различных стадий фиброза печени у детей. Российский педиатрический журнал. 2021; 24(1): 4-11.

7. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Алябьева Н.М., Зубкова И.В., Жужула А.А. Особенности изменений сывороточных концентраций прямых биомаркеров фиброзирования при хронических болезнях печени у детей. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2021; 100 (2): 112-118.

8. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Алябьева Н.М., Зубкова И.В., Жужула А.А. Возможность прогнозирования развития фиброза и цирроза при аутоиммунных заболеваниях печени у детей с помощью прямых биомаркеров. Доктор.Ру. 2021; 20(3): 24-28.

Монография

9. Фисенко А.П., Потапов А.С., Сурков А.Н., Анушенко А.О., Батырова А.С., Дворяковский И.В., Журкова Н.В., Кулебина Е.А., Кустова О.В., Лазуренко С.Б., Мовсисян Г.Б., Свиридова Т.В., Туманова Е.Л., Четкина Т.С. Болезнь Вильсона у детей. Под ред. А.Н. Суркова, А.С. Потапова, А.П. Фисенко. М.: НМИЦ здоровья детей, 2019; 84 с. (глава «Молекулярные основы фиброзирования печени»).

Публикации в других изданиях

10. Kulebina E., Surkov A. Transient Elastography Cut Points To Assess Liver Fibrosis In Children. Abstracts From IX Latvian Gastroenterology Congress With International Participation (December 7, 2019, Riga, Latvia), 2020: 18.

11. Gorinova Y., Surkov A., Smirnov I., Kulebina E., Simonova O., Ignatova A. Liver Damage in Cystic Fibrosis: Visualization Versus Serum Markers in Paediatrics. Journal of Cystic Fibrosis Absrtacts of the 43rd European Cystic Fibrosis Conference – 2020 (Lyon, France, 3-6 June 2020); 2020; 19 (Suppl.2): S123-S124.

12. Кулебина Е.А., Алябьева Н.М., Зубкова И.В., Жужула А.А. (научный руководитель – Сурков А.Н.). Сывороточное содержание коллагенов I и III типов при различных стадиях фиброза печени у детей. Российский педиатрический журнал. Тезисы Научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Студеникинские чтения-2020». 2020; 23(6): 404.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АИГ – аутоиммунный гепатит
АИХ – аутоиммунная холангиопатия
ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза
ГК – гиалуроновая кислота
ДИ – доверительный интервал
К-I – коллаген I типа
К-III – коллаген III типа
К-IV – коллаген IV типа
КТ – компьютерная томография
МНО – международное нормализованное отношение
МРХПГ – магнитно-резонансная холангиопанкреатография
ПБХ – первичный билиарный холангит
ППК – пропорциональная площадь коллагена
ПСХ – первичный склерозирующий холангит
ПТИ – протромбиновый индекса
ТЭ – транзиентная эластография
ФП – фиброз печени
ХБП – хронические болезни печени
ХГВ – хронический гепатит В
ХГС – хронический гепатит С
ЦП – цирроз печени
ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс