Федеральное государственное автономное учреждение

«Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Кулебина Елена Анатольевна

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ФИБРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ

14.01.08 – Педиатрия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Сурков Андрей Николаевич

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 5

ВВЕДЕНИЕ 8

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 17

1.1. Механизмы формирования фиброза печени: современные представления 17

1.1.1. Активированные миофибробласты 18

1.1.2. Воспалительные цитокины 19

1.1.3. Эпителиально-мезенхимальный переход 19

1.1.4. Звездчатые клетки печени 21

1.1.5. Трансформирующий фактор роста бета 22

1.2. Обзор современных лабораторных методов диагностики стадии фиброза печени на основе прямых биомаркеров фиброзирования 22

1.3. Неинвазивная диагностика фиброза печени: возможности инструментальных методик на современном этапе 25

1.3.1. Ультразвуковое исследование с контрастным усилением 25

1.3.2. Транзиентная эластография печени 27

1.3.3. Современные возможности магниторезонансной томографии в диагностике поражения печени 29

1.4. Оценка внутрипеченочного содержания коллагенов различных типов 32

1.4.1. Особенности отложения коллагенов при хронических болезнях печени 33

1.4.2. Полуколичественные методы оценки стадии фиброза печени 35

1.4.3. Пропорциональная площадь коллагена 36

1.4.4. Возможности математических моделей в диагностике фиброза печени 37

ГЛАВА 2. ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 40
2.1. Характеристика пациентов, дизайн исследования 40
2.2. Методы исследования 42
2.3. Статистическая обработка полученных данных 50
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ, ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ 51
3.1. Возрастная, гендерная и нозологическая характеристика обследованных пациентов 51
3.2. Клинико-лабораторные и инструментальные изменения при хронических болезнях печени у детей в зависимости от стадии фиброза и гистологической активности 55
ГЛАВА 4. ВАЛИДАЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭЛАСТОГРАФИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТАДИИ ФИБРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ 61
4.1. Показатели транзиентной эластографии в зависимости от стадии фиброза печени у обследованных детей 61
4.2. ROC-анализ показателей плотности печени для оценки стадии фиброза методом транзиентной эластографии 63
ГЛАВА 5. СЫВОРОТОЧНОЕ И ТКАНЕВОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРЯМЫХ БИОМАРКЕРОВ ФИБРОЗИРОВАНИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ 66
5.1. Особенности изменений сывороточных концентраций прямых биомаркеров фиброзирования при хронических болезнях печени у детей 66
5.2. Характеристика отложения коллагенов различных типов в ткани печени в зависимости от стадии фиброза 76
5.3. Параллелизм изменений сывороточного и тканевого содержания 82

прямых биомаркеров фиброзирования при хронических болезнях печени у детей
5.4. Возможность прогнозирования развития фиброза и цирроза при хронических поражениях печени у детей с помощью прямых биомаркеров 83
5.5. Оптимизация алгоритма диагностики и динамического мониторинга выраженности фиброза печени при хронических формах ее патологии у детей 85
ГЛАВА 6. КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ 87
6.1. Клинический случай №1 87
6.2. Клинический случай №2 95
6.3. Клинический случай №3 103
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ 112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 124
ВЫВОДЫ 125
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 129

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α-SMA – альфа-актин гладких мышц

AMA – антимитохондриальные антитела

ANCA – антинейтрофильные антитела

Anti-LKM1 – антитела к микросомам печени и почек

ASMA – антитела к гладкой мускулатуре

EASL – European Association for the Study of the Liver (Европейская ассоциация по изучению печени)

ELF – Enhanced Liver Fibrosis Test – лабораторная тест-система диагностики фиброза печени

HU – Hounsfield units (единицы Хаунсфилда)

IL-17 – интерлейкин 17

IL-22 – интерлейкин 22

IL-23 – интерлейкин 23

PAS – periodic acid-Shiff (периодическая Шифф-кислота)

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

PRO-C3 – N-terminal pro-collagen III peptide (N-концевой пептид проколлагена III типа)

PRO-C6 – C-terminal pro-peptide of type VI collagen (C-концевой пропептид коллагена VI)

TGF- β – трансформирующий фактор роста бета

АИГ – аутоиммунный гепатит

АИХ – аутоиммунная холангиопатия

АНФ – антинуклеарный фактор

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза

ГИС – гистологический индекс склероза

ГК – гиалуроновая кислота

ДИ – доверительный интервал

дМРТ – диффузионная магнитно-резонансная томография

ЗКП – звездчатая клетка печени

ИГА – индекс гистологической активности

К-I – коллаген I типа

К-III – коллаген III типа

К-IV – коллаген IV типа

КВ – контрастное вещество

КТ – компьютерная томография

МНО – международное нормализованное отношение

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МРТ – магнитно-резонансная томография

МРХПГ – магнитно-резонансная холангиопанкреатография

МСК – мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки

НАЖП – неалкогольная жировая болезнь печени

НИИ педиатрии им. Г.Н. Сперанского – Научно-исследовательский институт педиатрии им. Г.Н. Сперанского

ОШ – отношение шансов

ПБХ – первичный билиарный холангит

ППК – пропорциональная площадь коллагена

ПСХ – первичный склерозирующий холангит

ПТВ – протромбиновое время

ПТИ – протромбиновый индекс

РФ – Российская Федерация

ТВ – тромбиновое время

ТЭ – транзиентная эластография

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России – Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский

исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России – Федеральное государственное автономное учреждение высшего образования “Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова” Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

ФП – фиброз печени

ХБП – хронические болезни печени

ХГВ – хронический гепатит В

ХГС – хронический гепатит С

ЦДК – цветовое допплеровское картирование

ЦП – цирроз печени

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

ВВЕДЕНИЕ

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 [119]. 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 [13].

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) [107]. 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 [11].

Несмотря на бурное развитие медицинской науки в последние годы и разработку все новых методов лабораторной и инструментальной диагностики структурных изменений печени [3, 70], 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) [121]. Однако риск возникновения осложнений делает эту инвазивную процедуру

потенциально опасной, поэтому уже давно существует потребность в поиске альтернативных путей диагностики ФП [119].

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 [58, 86, 96, 100, 125]. 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 [48, 77, 131].

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 [128].

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 [85].

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 [73, 87, 91].

Многочисленные исследования показали, что транзиентная эластография (ТЭ) способна помочь в диагностике стадии ФП у детей при хронических болезнях печени (ХБП) [11, 94, 101] При этом значения плотности для дифференциации стадий фиброза отличаются в каждом исследовании [43]. Следует учесть, что в большинстве работ описаны показатели плотности печени при хронических вирусных гепатитах у взрослых [92, 95, 97], а данные о возможностях ТЭ для диагностики стадии фиброза при ХБП в детской популяции остаются ограниченными [62, 64, 110].

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.

Впервыев 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 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 имени 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 диагнстировать 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 – Москва, 6 сентября 2019 г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Осенние Филатовские чтения - важные вопросы детского здоровья" 27 сентября 2019, Пенза; Научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Студеникинские чтения» - Москва, 2 декабря 2019 г., 2 декабря 2020 г.; Вебинаре для практикующих врачей «Возможности неинвазивной диагностики фиброза при хронических заболеваниях 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ФП – динамический процесс отложения в печени соединительной ткани, который развивается при многих ХБП. В случае сохранения воздействия повреждающего агента фиброз прогрессирует вплоть до формирования цирроза. Единственной терапевтической возможностью при декомпенсированном ЦП является исключительно трансплантация органа. В настоящее время активно ведется поиск молекул и клеток, играющих ключевую роль в формировании фиброза. Понимание молекулярных механизмов развития ФП – ключевое направление работы ученых, занимающихся проблемой разработки антифибротической терапии [47, 118]

1.1. Механизмы формирования фиброза печени: современные представления

ФП, или избыточное развитие соединительной ткани, является ответом на повреждение печеночной паренхимы [4, 10, 12, 107].

В последние годы было доказано, что на ранних стадиях заболевания фиброз обратим: устранение причинно-значимого агента способно привести к регрессу фиброзирования, однако выраженный ФП трудно поддается обратному развитию [25]. При сохранении и персистенции повреждающего триггера регенерация печеночной ткани нарушается, что обусловливает прогрессирование ФП вплоть до цирротической трансформации и терминальной стадии заболевания с соответствующими осложнениями [6].

ЦП – серьезная проблема мирового здравоохранения [93, 129, 135]. К осложнениям цирроза относятся портальная гипертензия, печеночная энцефалопатия, печеночная недостаточность. Кроме того, сформированный ЦП - фактор риска гепатоцеллюлярной карциномы [117].

К настоящему времени мировая медицина не располагает апробированным лекарственным средством против печеночного фиброза [25]. Методом терапии

ЦП является исключительно трансплантация органа, однако из-за нехватки донорских органов человечество нуждается в разработке эффективного антифибротического лекарственного препарата [65, 118].

Звездчатые клетки печени (ЗКП) – главные предшественники миофибробластов, продуцирующих волокна ЭЦМ в процессе фиброгенеза. Трансформирующий фактор роста β (TGF-β) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF) – два основных цитокина, инициирующих активацию и пролиферацию ЗКП. Контроль процесса их активации – оптимальная стратегия терапии печеночного фиброза [71, 135]. Именно поэтому понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе активации звездчатых клеток, – ключевое направление работы ученых, занимающихся изучением механизмов формирования ФП [17].

1.1.1. Активированные миофибробласты

В нормальных тканях миофибробласты отсутствуют. Временная активация миофибробластов способствует восстановлению целостности ткани после повреждения путем образования рубца, который обычно редуцируется при восстановлении тканей – происходит удаление миофибробластов путем апоптоза или инактивации [55]. И, напротив, постоянная активация миофибробластов вызывает накопление коллагенового ЭЦМ, что в конечном итоге приводит к фиброзу.

Наиболее широко используемым маркером активности миофибробластов в исследованиях и клинической практике является экспрессия альфа-актина гладких мышц (α-SMA). Возможна оценка экспрессии таких маркеров, как F-актин, винкулин и ED-A фибронектин в ткани печени [56].

Установлено, что миофибробласты продуцируют компоненты соединительной ткани в почках, легких и печени, являясь при этом гетерогенной популяцией клеток. Происхождение миофибробластов зависит от типа поврежденной ткани и от характера ее повреждения. По данным литературы,

источниками миофибробластов при ФП могут быть эпителиальные, мезенхимальные, стромальные, мезотелиальные клетки, фиброциты, ЗКП и портальные фибробласты [108]. Хотя передовые генетические методы предоставили убедительные доказательства того, что ЗКП – это основной источник миофибробластов при многих типах экспериментального повреждения печени, некоторые противоречия в этом вопросе остаются неразрешенными до настоящего времени, как, например, вклад фиброцитов в популяцию миофибробластов, роль портальных фибробластов / миофибробластов при раннем холестатическом повреждении печени и возможное участие мезотелиальных клеток при внутрипеченочном холестазе [108].

1.1.2. Воспалительные цитокины

Недавние исследования продемонстрировали важную роль интерлейкинов 17, 22 и 33 (IL-17, IL-22, IL-23) в фиброгенезе. IL-17 продуцируют главным образом Т-хелперы 17, и активация его происходит при гепатите В и С, алкогольной болезни печени и аутоиммунном гепатите [51]. IL-17 является провоспалительным и профиброгенным цитокином, который активирует NF-κB и STAT3 в клетках Купфера и ЗКП. Стимулированные IL-17 звездчатые клетки повышают уровень коллагена I, αSMA и TGF-β, способствуя печеночному фиброзу [88]. Мыши с дефицитом IL-17 устойчивы к холестазу и токсин-индуцированному ФП. Интересно, что антифиброзный эффект передачи сигналов эндоканнабиноидным рецептором CB2 опосредуется путем ингибирования продукции IL-17 [50].

1.1.3. Эпителиально-мезенхимальный переход

Эпителиально-мезенхимальный переход – это процесс, при котором паренхиматозные (эпителиальные) клетки становятся миофибробластами [105]. Исследования, поддерживающие эту концепцию, были основаны на изучении

клеток, которые экспрессировали маркеры для эпителиоцитов и миофибробластов (например, выделяющих как цитокератин 19, так и коллаген типа I) и индуцированной TGF-β конверсии паренхиматозных клеток в фибробластоподобные клетки в культуре [105]. Однако эксперименты по отслеживанию клонов, которые постоянно маркируют холангиоциты (K19), гепатоциты (альбумин) или эпителиальные клетки-предшественники (альфа-фетопротеин), явно продемонстрировали, что миофибробласты, индуцированные в моделях ФП, не происходят от эпителиальных клеток. Эпителиальные клетки, такие как холангиоциты и гепатоциты, изменяют свои профили экспрессии генов во время повреждения печени и экспрессируют некоторые мезенхимальные маркеры. Это наиболее четко продемонстрировано в роли экспрессии de novo в гепатоцитах при CCl4-индуцированном ФП [41].

В некоторых работах по применению генетического картирования клеток, было показано, что эпителиально-мезенхимальный переход не способствует формированию пула миофибробластов и ФП у мышей. В исследованиях помечали гепатоциты и холангиоциты с использованием технологии Cre-loxP (Albumin-Cre, CK19-Cre и AFP-Cre, соответственно) и отслеживали эти клетки во время развития ФП. Результаты свидетельствуют о том, что источником миофибробластов не являются ни гепатоциты, ни холангиоциты [102].

Следует иметь в виду, что экспериментальные работы на животных не могут повторить все заболевания человека. Однако в настоящее время получены убедительные доказательства того, что эпителиально-мезенхимального перехода не происходит, а ЗКП – основной источник миофибробластов при гепатотоксическом ФП, портальные фибробласты вносят важный вклад в популяцию миофибробластов при раннем холестатическом повреждении печени, мезотелиальные клетки могут дифференцироваться в ЗКП и миофибробласты при повреждении печени [105].

1.1.4. Звездчатые клетки печени

ЗКП – главные предшественники активированных миофибробластов, которые, в свою очередь, являются главными продуцентами белков ЭЦМ при формировании ФП. Пул миофибробластов также образуют портальные фибробласты, источник которых – гепатоциты. Вклад различных типов клеток в пул миофибробластов может быть обусловлен разной этиологией печеночного фиброза [82].

Iwaisako K. с соавт. (2014) провели исследование с использованием фенотипического анализа для идентификации двух коллаген-продуцируюших клеточных популяций: витамин А-позитивные ЗКП и витамин А-негативные портальные фибробласты. Результаты показали, что миофибробласты дифференцируются из ЗКП при гепатотоксин-индуцированном фиброзе. На ранней стадии холестатических поражений печени главным источником пула миофибробластов служат портальные фибробласты [61].

Li Y. с соавт. (2013) показали, что в процессе печеночного повреждения происходит переход клеток мезотелия в пул ЗКП [30]. При этом мезотелиоциты способны к дифференцировке также и непосредственно в миофибробласты. В случае холестатического повреждения печени именно портальные фибробласты осуществляют вклад в миофибробластический пул клеток [78].

Seki E. с соавт. (2015) попытались установить, какие именно клетки являются предшественниками миофибробластов, на экспериментальной модели трансгенных мышей под контролем промотора лецитин ретинолацилтрансферазы (Lrat) – фермента, необходимого для метаболизма витамина А, экспрессия которого преимущественно происходит в ЗКП. Исследование показало, что последние являются первичными клетками, которые дифференцируются в миофибробласты при всех экспериментальных моделях ФП (токсическое, холестатическое поражение, жировой гепатоз). Ученые также продемонстрировали, что источником Lrat-положительных ЗКП не является

костный мозг, и кроме того, они не дифференцируются в гепатоциты и холангиоциты при регенерации печени [108].

1.1.5. Трансформирующий фактор роста β

TGF-β играет центральную роль в процессах фиброзирования [38]. Главные его продуценты – это печеночные макрофаги (клетки Купфера), а также ЗКП. TGF-β поступает из клеток в неактивной форме и в последующем активируется интегрином альфа-V (αv integrin) [54]. Связывание биоактивного TGF-β с рецептором TGF-β типа II фосфорилирует рецептор TGF-β типа I, что, в свою очередь, активирует Smad- и не-Smad пути активации апоптоза [37]. В ЗКП TGF-β-опосредованная активация пути Smad2/3 индуцирует продукцию К-I и К-III.

Ding N. и соавт. (2013) продемонстрировали роль ядерного рецептора витамина D (VDR) в модуляции Smad пути передачи сигналов TGF-β. Активация этого рецептора противодействует связыванию Smad с промоторной областью профиброгенных генов в ЗКП. Соответственно, дефицит фактора витамина D, наоборот, способствует, а лечение витамином D ослабляет скорость процесса фиброзирования печени у экспериментальных мышей [37].

Таким образом, в настоящее время патогенез формирования ФП остается не до конца выясненным. Понимание этапов продукции соединительнотканного матрикса откроет возможности патогенетической терапии ФП, что позволит предотвратить формирование цирроза у многих пациентов.

1.2. Обзор современных лабораторных методов диагностики стадии фиброза печени на основе прямых биомаркеров фиброзирования

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. Одним из

научных направлений стало изучение основных структурных компонентов соединительной ткани, таких как коллагены различных типов, в частности К-I, К-III, К-IV, ГК и другие, которые активно участвуют в формировании ЭЦМ [33, 49, 106, 114, 126].

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 [85].

В последние годы обсуждается информативность серологических биомаркеров коллагенообразования для индентификации стадий ФП [23].

Attalah A.M. с соавт. (2017), обследовав 125 пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) и хроническим гепатитом В (ХГВ), отметили, что концентрация К-III в сыворотке крови была значимо выше у больных со стадиями фиброза F2-F4 по сравнению с F1: 14,9±6,4 против 10,0±7,1 мкг/мл (p<0,009) [18].

В свою очередь Luo Y. с соавт. (2018) показали, что сывороточное содержание N-концевого пептида проколлагена III типа (N-terminal pro-collagen III peptide – PRO-C3) и С-концевого пропептида коллагена VI (C-terminal pro-peptide of type VI collagen – PRO-C6) было значимо выше (p<0,001) у пациентов с выраженным ФП и ЦП (F3-F4), чем на начальных стадиях поражения печени (F0-F2). Также выявлена связь высокой концентрации PRO-C3 с выраженной гистологической активностью процесса и баллонной дегенерацией гепатоцитов, но не со степенью стеатоза. Зафиксировано и снижение уровня PRO-C3 в случаях регресса ФП, что делает этот биомаркер потенциально полезным для оценки изменений стадии фиброза с течением времени [83].

Также Hansen J.F. с соавт. (2018), обследовав 270 пациентов с ХГС, показали, что содержание PRO-C3 в сыворотке крови возрастало по мере прогрессирования фиброза в соответствии со шкалой Ishak (p=0,001). Площадь под ROC-кривой для значительного фиброза (≥3 баллов) составила 0,75 (95% ДИ: 0,68-0,81), для ЦП (≥5 баллов) – 0,76 (95% ДИ: 0,68-0,84) [52].

Некоторые авторы высказывают мнение, что показатели PRO-C3 можно использовать в совокупности с другими параметрами, характеризующими поражение печени, для более точной диагностики выраженности ее структурных изменений с помощью различных математических моделей [36].

Так, Boyle M. с соавт. (2019) на основании обследования 449 пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП), доказали, что концентрация PRO-C3 положительно коррелирует с гистологической выраженностью стеатогепатита (r_s=0,367, p<0,001) и стадией фиброза (r_s=0,462, p<0,001). Затем с помощью метода логистической регрессии они разработали 2 прогностических модели для диагностики выраженного фиброза (F≥3): FIBC3 и упрощенную ABC3D, учитывающие возраст (≥50 лет), индекс массы тела (≥30), наличие сахарного диабета 2-го типа, количество тромбоцитов (≤200*10^9/л) и концентрацию PRO-C3 (≥15,5 нг/мл) в сыворотке крови. Площади под ROC-кривыми для этих алгоритмов составили 0,89 и 0,88, значения в точках cut-off: ≥–0,4 и ≥3, чувствительность – 83 и 77%, специфичность – 80 и 82%, соответственно [24].

Исследование Gudowska M с соавт. (2017) показало, что гиалуроновая кислота является главным компонентом внеклеточного матрикса соединительной ткани и играет основную структурную роль в формировании внеклеточного матрикса. Результаты показали высокую чувствительность и специфичность определения сывороточной концентрации гиалуроновой кислоты для диагностики стадии ФП, что позволяет использовать ее в лабораторной практике [49].

Таким образом, ЭЦМ представлен различными компонентами, среди которых основными являются К-I, К-III и К-IV, а также ГК [53, 91]. В последние годы определение их концентраций в сыворотке крови рассматривают в

качестве потенциальной методики для неинвазивной градации различных стадий ФП [103, 130], которая бы позволила отказаться от проведения биопсии печени, до настоящего времени прочно сохраняющей статус «золотого стандарта» диагностики выраженности структурных поражений органа [90]. Результаты проведенных исследований дали основание предполагать, что К-I, К-III, К-IV, а также ГК могут рассматриваться в качестве неинвазивных биомаркеров фиброза при хронических болезнях печени [31, 77, 133]. При этом следует отметить, что исследования, в которых были оценены диагностические возможности применения указанных биомаркеров, проведены в основном у взрослых, а в педиатрической когорте пациентов данные остаются ограниченными. Научные работы, посвященные фиброзированию печени и сывороточным биомаркерам фиброгенеза при хронических болезнях печени в педиатрии единичны, а их данные противоречивы по причине малых выборок пациентов, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

1.3. Неинвазивная диагностика фиброза печени: возможности инструментальных методик на современном этапе

Неинвазивная диагностика ФП основывается на биологических маркерах фиброгенеза и фибролиза или физических свойствах паренхимы печени. Наиболее широко применяемые в клинической практике инструментальные методы основаны на принципах эластографии для косвенного определения плотности ткани органа [2, 30, 134].

1.3.1. УЗИ с контрастным усилением

Ультразвуковое исследование (УЗИ) с контрастным усилением обычно используют для диагностики опухолей печени. Исследование выполняют с внутривенным болюсным введением контрастного вещества (КВ) и последующим

УЗИ в специальном режиме «контраст» с низким механическим индексом [9]. Однако в последние годы эту технику стали применять также и для оценки ФП – за счет изменений внутрипеченочной микроциркуляции на фоне фиброзной перестройки паренхимы органа [14].

Печень имеет двойное кровоснабжение: примерно одна треть кровотока - от печеночной артерии и две трети - от портальной вены. Сосудистые фазы при УЗИ с контрастным усилением печени схожи с таковыми, получаемыми при проведении компьютерной томографии (КТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ), прогрессируя от артериальной до портовенозной фазы, и заканчиваются поздней (отсроченной) фазой. Артериальная фаза начинается с попадания КВ в печеночную артерию. В зависимости от циркуляторного статуса это происходит от 10 до 20-й секунды после инъекции КВ. Портовенозная фаза начинается тогда, когда КВ попадает в основную портальную вену - примерно от 30 до 45 секунды. Артериальная и портовенозная фазы перекрываются, потому что последняя длится до 45 секунд. Поздняя фаза начинается после 120 секунд и длится до исчезновения микропузырьков из циркуляторного русла, примерно от 4 до 6 минут. Дополнительная постваскулярная фаза начинается через 10 минут после инъекции и длится до часа или дольше. Для диагностики стадии ФП исследованы два показателя: время прибытия КВ в печеночные вены и время внутрипеченочного транзита (определяется как задержка между прибытием контраста в воротную и печеночную вены). В одном из исследований значение времени прибытия контраста в печеночную вену, равное 17 секундам и менее показало 100% чувствительность и 93% специфичность для цирроза печени. Время прибытия КВ в печеночные вены значительно короче у пациентов с циррозом, чем у пациентов без цирроза [14]. Хотя измерение времени прибытия в печеночные вены является простым методом, оно имеет некоторые ограничения, например, при наличии внепеченочных сосудистых шунтов. Staub F. с соавт. (2009) использовали значение времени прибытия контраста в печеночную вену, равное 13 секундам, и установили диагноз выраженного фиброза (F3) со специфичностью 78,57%, чувствительностью 78,95%, прогностической

ценностью положительного результата 78,33%, прогностической ценностью отрицательного результата 83,33 % [112].

1.3.2. Транзиентная эластография печени

Фиброз проявляется снижением эластичности и увеличением плотности паренхимы печени, а эластография способна количественно оценить этот показатель [8, 15, 19, 45].

Существует два типа ультразвуковой эластографии [21, 67, 131, 136]:

1. статическая, или компрессионная эластография с оценкой деформации тканей (strain elastography);

2. динамическая эластография с применением:

- механического импульсного или вибрационного давления, с оценкой сдвиговых волн, возникающих при этом – транзиентная эластография (transient elastography) [76];

- акустического радиационного давления (ARFI), создаваемого длинным ультразвуковым сигналом и оценкой возникающих продольных деформаций [22];

- акустических радиационных импульсов давления, создаваемых ультразвуковыми сигналами, сфокусированными на разную глубину, с использованием оценки скорости сдвиговых волн – эластография сдвиговой волны (shear wave elastography) [96]

ТЭ (с использованием аппарата Fibroscan) стала первым ультразвуковым эластографическим методом для оценки эластичности путем измерения скорости упругих сдвиговых волн в паренхиме, генерируемых механическим толчком. Первые клинические данные с использованием этого метода были опубликованы в 2003 году [104]. Методика широко описана в литературе [138]: обследование проводится натощак, пациент максимально отводит кзади правую руку, исследователь располагает ультразвуковой датчик над правой долей печени через межреберье, аппарат производит механическую вибрацию, которая генерирует упругие поперечные волны, распространяющиеся через ткань. Скорость волн

измеряется и выражается в килопаскалях, при этом она прямо коррелирует с упругостью ткани. Чем больше плотность ткани, тем быстрее распространяется поперечная волна. ТЭ проста в исполнении, хорошо переносится пациентами и дает немедленный результат. Техника не зависит от оператора. Плотность печени рассчитывается как медиана 10 валидных (успешных) измерений. Измерения с межквартильным диапазоном менее 30% от медианного значения и количеством успешных измерений более 60% считаются надежными [62]. Проведенные научные исследования продемонстрировали хорошую воспроизводимость метода [44]. ТЭ изначально была апробирована для оценки ФП у пациентов с ХГС [141], а затем была проведена оценка метода при ХБП другой этиологии [32].

Метаанализ, опубликованный Tsochatzis E. с соавт. (2011), включал 40 исследований пациентов с ХБП различной этиологии (ХГВ и ХГС, алкогольная болезнь печени и др.). Данные, касающиеся пациентов с ХГС, были получены из 14 исследований, и суммарная чувствительность и специфичность составили 78% и 80%, соответственно, для прогнозирования значительного фиброза (F3 по METAVIR). Данные пациентов с ХГВ – из 4-х исследований, суммарная чувствительность составила 84%, а суммарная специфичность – 78%. В этом анализе для прогнозирования цирроза печени (F4 при биопсии) чувствительность составила 83%, специфичность – 89%, а среднее оптимальное предельное значение - 15,0 ± 4,1 кПа (медиана 14,5 кПа). Чувствительность и специфичность для прогнозирования фиброза F2 – 0,79 и 0,78 соответственно. Среднее оптимальное значение для F2 составило 7,3 ± 1,4 кПа (медиана 7,2 кПа) [122].

Европейская федерация обществ ультразвука в медицине и биологии (EFSUMB) опубликовала руководство, в котором значения выше 6,8-7,6 кПа при хроническом вирусном гепатите могут свидетельствовать о наличии значительного ФП ($F \geq 2$) с высокой вероятностью, в то время как диапазон 11,0-13,6 кПа может указывать на цирротическую стадию ($F = 4$) [35].

Рекомендации Европейской ассоциации по изучению печени (EASL) указывают, что ТЭ можно использовать для оценки ФП у пациентов с ХГС [39, 40].

Многие исследования показали, что ТЭ - высокочувствительный метод, способный дифференцировать слабый фиброз от значительного, но при этом не являющийся достаточно точным для разграничения стадий незначительного фиброза (F1 и F2) [16] Ограничения ТЭ включают потребность в дорогостоящем оборудовании и отсутствие стандартизированных значений плотности для дифференциации стадий фиброза. Кроме того, ТЭ трудновыполнима у пациентов с избыточно развитой подкожно-жировой клетчаткой и асцитом.

Согласно последним научным данным, ТЭ способна помочь в диагностике стадии ФП у детей ХБП. При этом значения плотности для дифференциации стадий фиброза отличаются в каждом исследовании [43]. Следует учесть, что в большинстве работ описаны показатели плотности печени при хронических вирусных гепатитах во взрослой популяции, а данные о возможностях ТЭ для диагностики стадии фиброза при ХБП в детской популяции остаются ограниченными, что обуславливает необходимость дальнейших исследований.

1.3.3. Современные возможности магниторезонансной томографии в диагностике поражения печени

МРТ используют для диагностики цирроза и его осложнений. Оценка минимального/умеренного фиброза (F1/F2) - более сложная задача, и для этой цели изучают несколько новых магнитно-резонансных методик.

К макроструктурным изменениям паренхимы печени при фиброзе относят фиброзные септы и узлы регенерации. Кроме того, МРТ позволяет диагностировать наличие спленомегалии с вычислением объема органа, варикозного расширения вен портальной системы и асцита. Использование внутривенного контрастирования улучшает визуализацию фиброза и связанных с циррозом осложнений (артерио-портальные шунты, гепатоцеллюлярная карцинома) [42].

Физическая основа магнитно-резонансной эластографии (МР-эластографии) – скорость и длина волны, распространяющейся в ткани печени: чем больше

плотность ткани, тем больше скорость распространения волны. Для выполнения МР-эластографии требуется специальное программное и аппаратное обеспечение. Устройство привода располагается над правой верхней частью живота пациента и генерирует волны акустического давления с частотой 40-120 Гц, которые создают сдвиговые волны в печени. Программа получает изображения распространяющейся механической волны, и алгоритм генерирует карту количественного отображения плотности ткани печени. Оценка плотности паренхимы органа коррелирует со стадией ФП и позволяет дифференцировать цирроз от фибротических изменений. МР-эластография имеет большую чувствительность для оценки фиброза и цирроза печени по сравнению со стандартной МРТ. В отличие от ультразвукового исследования (УЗИ), МР-эластография не зависит от оператора, на результаты не влияет наличие у пациента избыточной массы тела или асцита. Huwart L. с соавт. (2008) показали, что МР-эластография - более точный метод диагностики фиброза, чем транзиентная эластография и APRI (отношение аспартатаминотрансферазы к количеству тромбоцитов) [57].

В метаанализе 12 исследований, опубликованном Singh S. с соавт. (2015), МР-эластография показала высокую чувствительность и специфичность для диагностики прогрессирующего фиброза (F3 по шкале METAVIR), вне зависимости от возраста, пола, индекса массы тела и этиологии заболевания печени. В качестве стандарта пациентам была выполнена биопсия печени [109]. К ограничениям МР-эластографии можно отнести ее стоимость и большую длительность исследования. На плотность печени и, соответственно, точность результатов МР-эластографии также могут влиять перегрузка органа железом, стеатоз, холестаз и портальная гипертензия [20, 81, 127, 137].

Диффузионная МРТ (дМРТ) оценивает способность протонов диффундировать в ткани. Этот метод обычно используют у пациентов с заболеваниями онкологического профиля. В исследованиях учеными была предпринята попытка выявления взаимосвязи между сниженным значением кажущегося коэффициента диффузии, которое появляется при фиброзе, и

степенью фиброза. Razek M. с соавт. (2011) установили, что сниженное значение показателя коэффициента диффузии коррелирует с ФП у детей и взрослых. Ограничения дМРТ в оценке фиброза связаны с тем, что на диффузию влияют стеатоз печени, наличие железа в ткани и воспалительные изменения. Кроме того, исследование чувствительно к артефактам, связанным с движением пациента, поскольку степень достоверности количественного анализа основана на качестве полученных изображений [99].

В последние годы значение МРТ в гепатологии значительно возросло благодаря широкому спектру применяемых контрастных веществ, как клинически доступных, так и находящихся в стадии разработки, которые добавляют функциональную информацию к анатомически детализированным морфологическим изображениям или увеличивают дифференциацию между нормальной и патологически измененной тканью. Для проведения МРТ печени с контрастным усилением доступно несколько классов контрастных агентов, которые включают:

- обычные неспецифические контрастные вещества для внеклеточной жидкости, используемые для оценки тканевой перфузии;
- контрастные вещества, специфичные для гепатобилиарной системы, которые поглощаются функционирующими гепатоцитами и выводятся через билиарную систему, применяемыми для оценки функции гепатобилиарной системы;
- суперпарамагнитные частицы оксида железа, которые накапливаются в клетках Купфера;
- новые молекулярные контрастные вещества, которые биохимически нацелены на специфические молекулярные / клеточные процессы для определения стадии поражения печени или динамической оценки состояния органа на фоне терапии.

Таким образом, использование различных функциональных и молекулярных методов МРТ позволяет неинвазивно оценивать тяжесть болезни, прогрессирование и реакцию на лечение при различных заболеваниях печени [89].

В частности, в научных кругах активно обсуждаются возможности фибрин-специфичного и коллаген-специфичного нацеливания при использовании визуализационных техник [28, 113].

Chow A.P. с соавт. (2013) на экспериментальной мышиной модели продемонстрировали, что, применяя динамическую МРТ с использованием наноглобулярного контрастного агента, нацеленного на циклический декапептид CLT1, возможно выявлять фибрин-фибронектиновые комплексы в ЭЦМ и, тем самым, обнаруживать фиброз и определять его стадию в поврежденной печени [34].

Salarian M. с соавт. (2019) сообщили о результатах применения контрастного вещества на основе белка, нацеленного на коллаген I типа (ProCA32.collagen1) и обладающего сильным сродством к нему. С помощью этого агента оказалось возможным надежно обнаруживать ФП на ранней стадии (стадия Ishak 3 из 6) и неалкогольный стеатогепатит (стадия Ishak 1 из 6 или 1 А Мягкая) на животных моделях с помощью режимов двойного контрастирования. Кроме того, ProCA32.collagen1 позволил определить изменения сосудистой сети, связанные с внутрипеченочным ангиогенезом и портальной гипертензией на поздних стадиях фиброза [102].

1.4. Оценка внутрипеченочного содержания коллагенов различных типов

Установлено, что матрикины – пептиды, образующиеся в результате фрагментации белков ЭЦМ, – играют важную роль как в физиологических, так и патологических процессах, протекающих в организме человека. Они обладают биологической активностью, сильно отличающейся от их родительского белка. В последнее десятилетие идентификация таких биоактивных областей в белках ЭЦМ привлекла внимание исследователей со всего мира. Матрикины, идентифицированные в основных белках ЭЦМ, таких как коллаген, эластин, фибронектин и ламинин, активно изучаются для использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине [63].

Коллаген – самый распространенный белок в организме человека, присутствующий в костях, печени, почках, сердце, зубах и коже и обеспечивающий необходимую структурную основу этих тканей. Однако при развитии какого-либо патологического состояния нарушается хрупкий баланс между типами коллагена в ЭЦМ, что влечет за собой развитие фиброза. Считается, что увеличение соотношения К-I : К-III обеспечивает дополнительную жесткость структуре ткани, тогда как уменьшение этого показателя, напротив, придает эластичность и гибкость ткани.

Основными участниками процесса ремоделирования ЭЦМ, как нормального, так и патологического, являются клетки фибробластов, секретирующие предшественники коллагена и матриксных металлопротеиназ, причем последние ответственны за деградацию ЭЦМ. Многие пептиды коллагена были идентифицированы из различных типов коллагена, и было показано, что они регулируют такие процессы, как пролиферация клеток, миграция, апоптоз и снижают ангиогенез. Наибольший интерес представляют коллаген интерстициального матрикса (тип I) и коллаген базальной мембраны (тип IV) [66, 68].

Исследования показывают, что коллаген I типа может быть применен на разграничения ФП на начальных стадиях. Исследования соотношений коллагенов различных типов на каждой из стадий ФП способно помочь в диагностике структурных изменений печени при хронических формах ее патологии.

1.4.1. Особенности отложения коллагенов при хронических болезнях печени

Интерес представляют данные Jović M. с соавт. (2018) о компонентах печеночного ЭЦМ в период пренатального развития. Так, К-I был обнаружен ближе к концу 1-го триместра в капсуле печени и стенках междольковых вен. По мере созревания печени плода содержание К-I увеличивается в капсуле, соединительной ткани портальной области, стенках артерий, центральных и междольковых венах, а также в синусоидах. В середине 1-го триместра К-III и IV

появляются в капсуле, портальных областях и стенках центральных вен, а в особенности в синусоидах. Во 2-м и 3-м триместрах эти коллагены все больше присутствуют во всех структурах, но К-IV также идентифицируется в нервных волокнах [63].

Важно отметить, что при патологическом состоянии увеличивается именно соотношение К-I, III и V к К-IV, а не их абсолютное количество, что и определяет клеточную дисфункцию, как это имеет место при капилляризации синусоидов на фоне печеночного фиброгенеза, когда возрастает содержание К-IV, остающееся при этом сниженным по сравнению с интерстициальными (фибриллярными) коллагенами. Семейство коллагенов насчитывает 28 типов белков с различными источниками происхождения и многообразными функциями. Например, сетеобразующий К-IV вырабатывается эпителиальными и эндотелиальными клетками и необходим для процесса восстановления тканей, который обеспечивает выживание и функционирование поляризованных клеток и нормальную работу тканей, в то время как фибриллообразующие К-I и III продуцируются фибробластами для поддержания их функции и в качестве основного перицеллюлярного «клея и структуры» при тканевой репарации [65].

Среди единичных работ, в которых проводилась оценка содержания коллагенов непосредственно в ткани печени у детей, можно выделить исследование Longo-Santos L.R. с соавт. (2017). Они обследовали 36 пациентов с билиарной атрезией, которым была выполнена биопсия до и после гепатопортоэнтеростомии по Касаи. Перисинусоидальное отложение К-III и V типов было более выраженным в исходных биоптатах (p<0,01), тогда как отложение К-I и IV указывало на прогрессирование заболевания (p<0,01). Пациенты с большим количеством перисинусоидального К-I в исходных биоптатах имели худшие кривые времени прогрессирования патологии до трансплантации печени (p=0,04) [80].

1.4.2. Полуколичественные методы оценки стадии фиброза печени

Для морфологической диагностики стадии ФП в настоящее время используется несколько шкал [121]:

1. Шкала Knodell. Проводится морфологическая оценка степени воспалительной инфильтрации портальных трактов (площадь поражения): слабая – при площади поражения <1/3 портального тракта (1 балл), умеренная – при площади, равной 1/3 или 2/3 (2-3 балла), выраженная – при площади поражения более 2/3 портального тракта (4 балла); некроз гепатоцитов (разрушение паренхимы воспалительным инфильтратом): лобулярный (1-4 балла), ступенчатый (1-4 балла), мостовидный (5-6 баллов), мультилобулярный (10 баллов).

2. Шкала Desmet. Стадия фиброза оценивается качественно по шкале от 0 до 4, где F0 – отсутствие фиброза, F1 – фиброз портальных трактов, F2 – фиброз портальных трактов с порто-портальными септами без нарушения архитектуры печени, F3 – фиброз портальных трактов с порто-портальными и порто-центральными септами с нарушением архитектоники печени, F4 – формирование ложных долек (цирроз).

3. Шкала METAVIR. Стадия фиброза также оценивается качественно по шкале от 0 до 4. F0 – отсутствие фиброза, F1 – склероз портальных трактов при отсутствии септ, F2 – портальный фиброз и немногочисленные порто-портальные септы, F3 – многочисленные порто-портальные и порто-центральные септы, F4 – сформированные ложные дольки (цирроз печени).

4. Шкала Ishak. Стадия фиброза качественно оценивается по шкале от 0 до 6. F0 – нет фиброза, F1 – фиброз отдельных портальных трактов, F2 – фиброз >50% портальных трактов, F3 - фиброз >50% портальных трактов плюс одиночные порто-портальный септы, F4 – фиброз >50% портальных трактов плюс одиночные порто-портальный септы плюс мостовидный фиброз (наличие порто-центральных септ), F5 – формирующийся цирроз (образование ложных долек), F6 – сформированный ЦП.

Не так давно группа китайских исследователей во главе с Sun Y. (2017) предложила новую Пекинскую классификацию для оценки динамики ФП, в основу которой легли следующие качественные изменения соединительной ткани:

- преимущественно прогрессирующие (толстые/широкие/рыхлые/слабо прокрашивающиеся септы с признаками воспаления);
- преимущественно регрессивные (нежные/тонкие/компактные/расщепляющиеся септы);
- неопределенные, которые демонстрируют промежуточные (сбалансированные) изменения [116].

Однако информативность этой полуколичественной классификации пока была показана только у взрослых пациентов с хроническим гепатитом В, получавших противовирусную терапию, поэтому ее применение при других нозологических формах ХБП, тем более у детей, в настоящее время не определено.

Кроме того, эти полуколичественные системы стадирования ФП обеспечивают нелинейную, категориальную оценку заболевания, что может ограничивать точность и детализацию данных, особенно в случаях на границе между двумя категориями или в контексте тонких изменений степени фиброза при терапии [26]. Таким образом, существует потребность в стандартизированных количественных шкалах, которые могут более точно фиксировать интервальные изменения и, таким образом, быть более чувствительными к терапевтическим реакциям.

1.4.3. Пропорциональная площадь коллагена

В исследованиях последних лет была показана информативность измерения так называемой пропорциональной площади коллагена (ППК) – collagen proportionate area. Это методика количественной оценки фиброзной ткани при биопсии печени путем измерения количества отложения коллагена, окрашенного

пикросири усом красным, как доли от общей площади биоптата. Было показано, что оценка ППК предсказывает клинические исходы у пациентов с ХГС и может субклассифицировать цирроз печени. Так, Calvaruso V. с соавт. (2015), обследовав 118 пациентов с ХГС, оценили у них ППК. При многофакторном регрессионном анализе Кокса значение этого показателя ≥18% (ОР: 3,99, 95% ДИ: 1,04-11,45; *p*=0,036), концентрация альбумина (ОШ: 0,12, 95% ДИ: 0,04-0,43; *p*=0,001) и наличие варикозного расширения вен пищевода (ОШ: 8,15, 95% ДИ: 2,31-28,78; *p*=0,001) независимо ассоциировались с печеночной декомпенсацией [27]

Buzzetti E. с соавт. (2019) проверили роль ППК как предиктора печеночной декомпенсации и связанной с ней смертностью в когорте из 437 пациентов с морфологически доказанной НАЖБП. Также используя модель Кокса, которая включала летальный исход, не связанный с патологией печени, в качестве конкурентного риска, авторы пришли к выводу, что при наличии стадии ФП ≥ F3 у субъектов с более высокими значениями ППК чаще развивается печеночная декомпенсация и связанная с ней смертность, таким образом доказав, что этот параметр может использоваться в качестве дополнения для прогнозирования клинического исхода у пациентов с НАЖБП [26].

Israelsen M. с соавт. (2020), обследовав 386 пациентов с алкогольной болезнью печени, показали, что независимыми предикторами смертности, связанной с поражением печени, были более высокие значения ППК (ОШ: 1,04, 95% ДИ: 1,02-1,04) и прогрессирующий фиброз (ОШ: 2,80, 95% ДИ: 1,29-6,05). При ранней/компенсированной алкогольной болезни печени этот показатель был единственным независимым предиктором печеночной декомпенсации и связанной с ней смертностью (ОШ: 1,08, 95% ДИ: 1,06-1,11) [60].

1.4.4. Возможности математических моделей в диагностике фиброза печени

Несмотря на активное применение вышеуказанных различных полуколичественных шкал оценки стадий ФП (Desmet, Ishak, METAVIR),

разработанных в прошлые годы, существует острая потребность в более информативных методиках, которые были бы лишены субъективности.

В последние годы в некоторых исследованиях были использованы математические модели, воплощенные с помощью аналитических инструментов визуализации для количественной оценки коллагена в органах и построенные по принципу организации и функционирования биологических нейронных сетей. Такие автоматизированные измерения показали очень хорошие результаты при сопоставлении с данными стандартного гистологического исследования.

Например, Sun Y. с соавт. (2018) разработали полностью количественный автоматизированный морфометрический метод для оценки ФП (quantitative assessment of liver fibrosis – qFibrosis), в основу которого легла визуализирующая микроскопия второй гармоники / двухфотонно-возбужденная флуоресценция (SHG / TPEF). Модель была успешно апробирована у взрослых пациентов (n=162) с ХГВ при оценке динамики фиброзирования на фоне противовирусной терапии [115].

Stasi C. с соавт. (2018), обследовав 143 пациентов с ХБП в основном вирусной этиологии, сравнили у них значения ППК и показатели теста для диагностики тяжести ФП – Enhanced Liver Fibrosis (ELF), включающего значения сывороточных концентраций ГК, PRO-C3 и тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1, объединенных в математический алгоритм. Оказалось, что параметры ППК и ELF увеличивались с ухудшением стадии фиброза по шкале Ishak (p<0,001), а их медианные значения значимо различались между стадиями по Ishak (p<0,001). Наблюдалась значимая корреляция между показателями ППК и ELF (r=0,5). Согласно данным ROC-анализа, ППК и ELF имели сходную диагностическую точность при выявлении ЦП, но ППК имела более высокую диагностическую точность, чем ELF при выявлении значительного ФП или его отсутствия. Причем высокие баллы ELF наблюдались у пациентов без ЦП, у которых летальный исход не был связан с патологией печени [111].

Совсем недавно Leow W.-Q. с соавт. (2020) усовершенствовали диагностический алгоритм qFibrosis, включив в него новые показатели и изменив

формулировку ранее существовавших параметров, характеризующих абсолютное количество, долю, длину, ширину агрегированных и разрозненных соединительно-тканных волокон в перипортальной и перисинусоидальных зонах, и показали высокую информативность метода у субъектов (*n*=160) с неалкогольным стеатогепатитом для разграничения незначительного (F1) и умеренного (F2) фиброза [75].

В последние годы уделяется большое внимание идентификации компонентов ЭЦМ непосредственно в ткани печени. Разработка математических моделей диагностики печеночного фиброза также нашла отражение в научных работах последних лет. При этом основной задачей остается диагностика начальных и промежуточных стадий ФП, а также активности фиброзирования, особенно в детской популяции, что обуславливает необходимость продолжения исследований в этом направлении.

ГЛАВА 2. 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).

2.1. Характеристика пациентов, дизайн исследования

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.

Размер выборки предварительно не рассчитывали, что было регламентировано редкостью патологии.

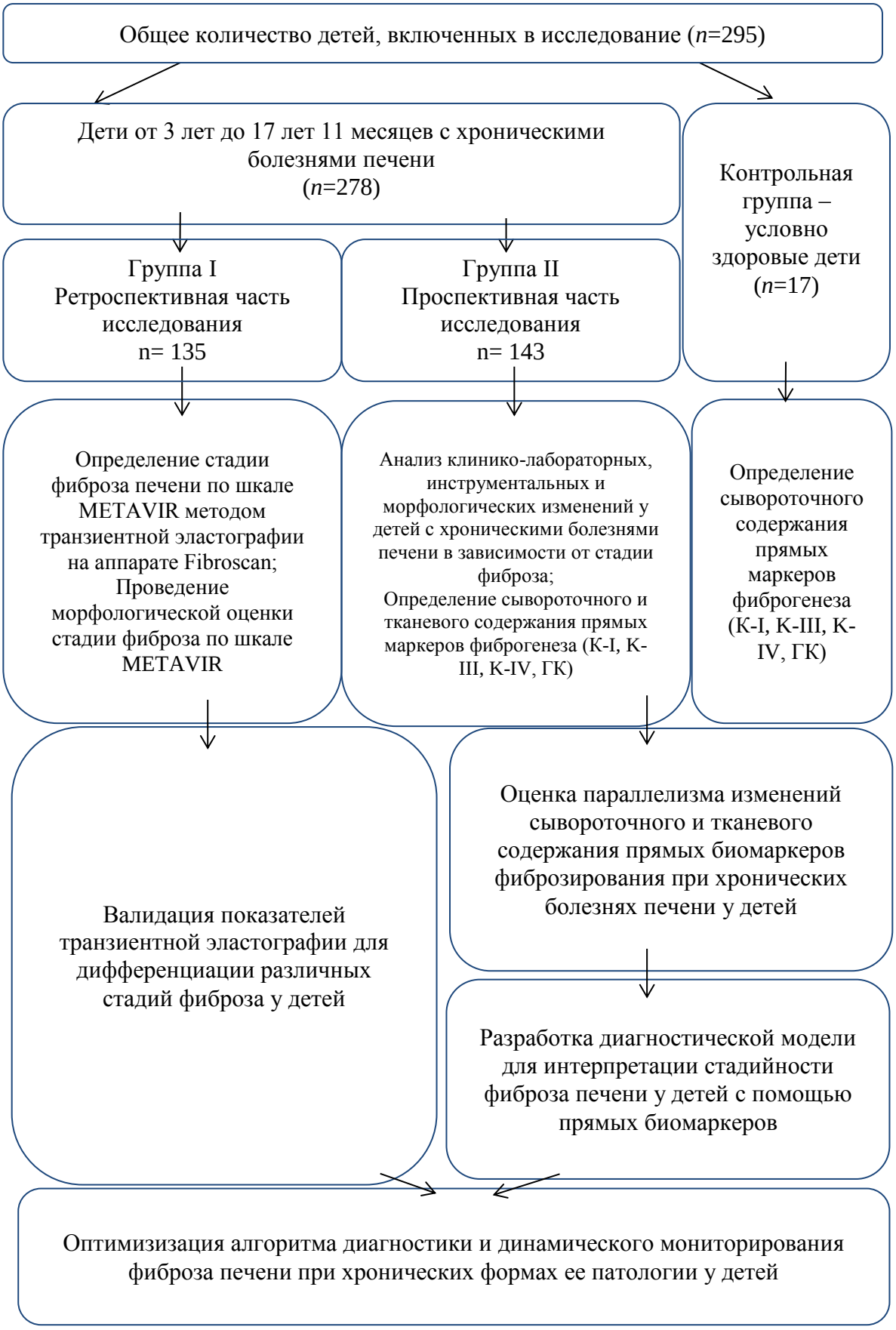


Рисунок 1 - Дизайн исследования: ретроспективно-проспективное нерандомизированное неконтролируемое исследование

Критерии включения:

• пациенты мужского и женского пола в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 мес; наличие ХБП, подтвержденной на основании результатов клинического, лабораторного и инструментального обследования; подписанное пациентом либо родителем несовершеннолетнего пациента формы информированного согласия на проведение инвазивного вмешательства.

Критерии невключения:

• отказ от подписания информированного согласия; неспособность ребенка коммуницировать с исследователем; любые неврологические и психические заболевания; наличие выраженной коагулопатии; тяжелое соматическое состояние; противопоказания для инвазивного вмешательства; избыточная масса тела и наличие асцита в связи с техническими ограничениями проведения ТЭ данным пациентам.

Исследование осуществлено в соответствии с Хельсинкской декларацией, принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия). Согласно Федеральному закону «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22 июля 1993 г. №5487-1, информированное согласие получено от всех пациентов в возрасте 15–18 лет и от родителей пациентов, не достигших 15-летнего возраста.

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

2.2. Методы исследования

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 (Рисунок 2), 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.



Рисунок 2 – Методика проведения транзиентной эластографии печени

В качестве референса использовали микроморфологическую оценку биоптата печени, при этом биопсию проводили в промежутке не более 6 месяцев от даты выполнения ТЭ. Для оценки стадии фиброза использовали шкалу METAVIR: F0 – отсутствие фиброза, F1 – склероз портальных трактов при отсутствии септ, F2 – портальный фиброз и немногочисленные порто-портальные

септы, F3 – многочисленные порто-портальные и порто-центральные септы, F4 – сформированные ложные дольки (цирроз печени) [123]. Гистопатологические данные сопоставляли с результатами ТЭ.

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. Операционная бригада в составе хирурга и ассистента располагалась по боковым сторонам ребенка, мониторы находились с лицевой стороны ребенка. Под контролем камеры производили установку двух манипуляционных троакаров – 5 мм. Первый троакар вводили по правой среднеключичной линии на 2-3 см выше подвздошной кости, второй троакар устанавливали по левой среднеключичной линии на 2-3 см выше подвздошной кости. при помощи ультразвукового скальпеля и изогнутого зажима проводили краевую резекцию фрагмента левой доли печени. Полученный гепатобиоптат извлекали из брюшной полости, погружали в 10% раствор формалина.

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.

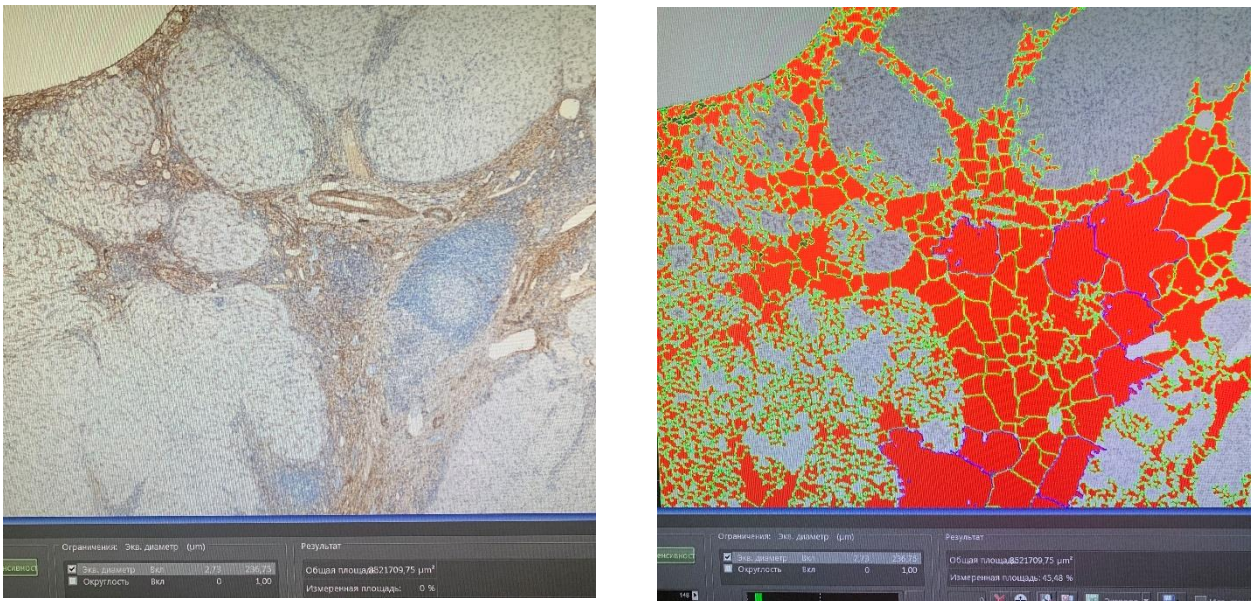
Затем парафиновые срезы образцов ткани печени толщиной 5 мкм монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизином. Для определения экспрессии белков применяли антитела к К-I, К-III и К-IV. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 20 минут в 3% перекиси водорода. Иммуногистохимические 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 (Рисунок 3), используя программное обеспечение Nikon elements BR (Рисунок 4А-Б) и методику подсчета ППК.



Рисунок 3 – Внешний вид микроскопа Nikon и цифровой камеры DS-Ri2

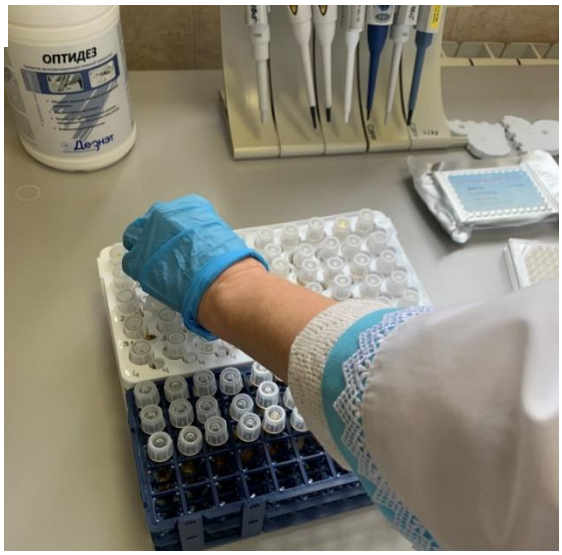


А **Б**

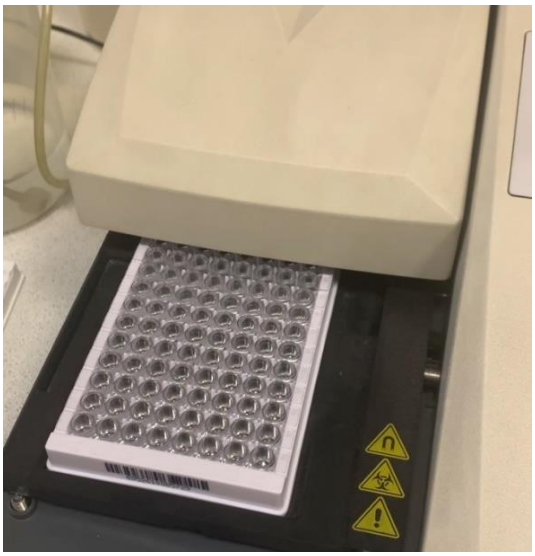
Рисунок 4А-Б – Методика оценки площади отложения коллагена в ткани печени с помощью программного обеспечения Nikon elements BR. А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV, увеличение 4х; Б – подсчет площади отложения К-IV по отношению к общей площади ткани печени

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.) (Рисунок 5А-В).



А



Б



В

Рисунок 5А-В – Методика иммуноферментного анализа на медицинском микропланшетном ридере Sunrise: А – подготовка образцов сыворотки; Б – автоматическое промывание планшета при помощи вошера; В – добавление в лунки стоп-раствора

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. Подготовку реагентов выполняли следующим образом: перед использованием все компоненты набора и образцы сывороток доводили до комнатной температуры (18-25°C). Приготовление стандартного раствора: концентрация стандарта в исходном растворе составляла 500 нг/мл. Подготавливали 7 пробирок, содержащих 0,5 мл стандартного разбавителя, и производили серию двойных разведений. Перед следующим переносом тщательно перемешивали каждую пробирку. В результате разведений были получены следующие результаты: 500 нг/мл, 250 нг/мл, 125 нг/мл, 62,5 нг/мл, 31,2 нг/мл, 15,6 нг/мл, 7,8 нг/мл и 0 нг/мл. Реагенты А и В центрифугировали и разводили до рабочей концентрации в 100 раз разбавителем для анализа А и В соответственно. Исходные 20 мл концентрата промывочного раствора разбавляли 580 мл деионизированной или дистиллированной воды, для приготовления 600 мл промывочного раствора.

При проведении процедуры анализа выполняли следующие манипуляции:

1. Определяли лунки для разбавленного стандарта, холостого опыта и образца. Подготовить 7 лунок для стандарта, 1 лунку для бланка. Добавляли по 100 мкл каждого разведения стандарта, бланк и образцы в соответствующие лунки, накрывали пластину герметиком, инкубировали 1 час при 37°C.

2. Затем удаляли жидкость из каждой лунки, не промывая.

3. Добавляли 100 мкл реагента А в каждую лунку, накрывали лунки герметиком для планшетов и инкубировать в течение 1 часа при 37°C.

4. Далее аспирировали раствор и промывали 350 мкл 1-кратного промывочного раствора в каждую лунку, используя шприц, многоканальную пипетку, распределительный дозатор или автоматическую мойку, и оставляли на 1-2 минуты. Полностью удаляли оставшуюся жидкость из всех лунок, защелкнув планшет на абсорбирующей бумаге. Полностью промывали 3 раза. После последней промывки удаляли остатки промывочного буфера путем аспирации или декантации. Переворачивали пластину и промакивали ее абсорбирующей бумагой.

5. Добавляли 100 мкл рабочего раствора В в каждую лунку, накрывали лунки герметиком для планшетов и инкубировали в течение 30 минут при 37°С.

6. Повторяли процесс аспирации / промывки всего 5 раз, как в шаге 4.

7. Добавляли 90 мкл раствора субстрата в каждую лунку. Накрывали новым герметиком для пластин. Инкубировали 10-20 минут при 37°С (не более 30 минут). Берегли от света. Жидкость становилась синей при добавлении раствора субстрата.

8. Добавляли 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку. При добавлении стоп-раствора жидкость становилась желтой. Смешивали жидкость, постучав по планшету. Если изменение цвета не казалось однородным, осторожно стучали по планшету, чтобы обеспечить тщательное перемешивание.

9. Удаляли капли воды и отпечатки пальцев с нижней части пластины и, убедившись, что на поверхности жидкости нет пузырьков, запускали считыватель микропланшетов и проводили измерение при 450 нм.

В использованных тест-системах нормальные значения концентраций изучаемых биомаркеров указаны не были, в связи с чем за референтные 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 здоровых детей (*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

2.3. Статистическая обработка полученных данных

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.

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ, ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ

3.1. Возрастная, гендерная и нозологическая характеристика обследованных пациентов

В ретроспективную часть исследования (группа I) было включено 135 пациентов, из них 39% мальчиков и 61% девочек. Медиана возраста на момент обследования составила 10,1 лет [9,6; 16 лет]. Минимальный возраст – 3 года, максимальный – 17 лет. Распределение по нозологическим формам представлено в Таблице 2.

Таблица 2 – Распределение обследованных пациентов по нозологическим формам хронических болезней печени в группе I (*n*=135)

Нозологическая форма	**Количество пациентов, абс.**	**Количество пациентов, отн. (%)**
АИГ	50	37
ПСХ	15	11,1
БВ	36	26,7
ХГВ+ХГС	34	25,2
Итого	135	100

II группа (проспективная часть исследования) составила 143 ребенка с хроническими болезнями печени (Таблица 3) в возрасте от 5 до 17 лет 11 мес. Среди детей 42% составили мальчики (*n*=60), 58% - девочки (*n*=83). Распределение пациентов по нозологическим формам: преобладали дети с АИГ – 56 (39%); аутоиммунный гепатит в сочетании с первичным склерозирующим холангитом (АИГ+ПСХ) имел место у 32 (22%) пациентов; ПСХ был

диагностирован у 25 (18%) детей; аутоиммунный гепатит в сочетании с аутоиммунной холангиопатией (АИГ+АИХ) – у 14 (10%); первичным билиарным холангитом (ПБХ) и аутоиммунным холангитом (АИХ) страдали – по 6 детей (4%) соответственно; аутоиммунный гепатит в сочетании с первичным билиарным холангитом (АИГ+ПБХ) был верифицирован у 4 детей (3%).

Таблица 3 – Распределение обследованных пациентов по нозологическим формам хронических болезней печени в группе II (*n*=143)

Нозологическая форма	**Количество пациентов, абс.**	**Количество пациентов, отн. (%)**
АИГ	56	39
АИГ+ПСХ	32	22
ПСХ	25	18
АИГ+АИХ	14	10
ПБХ	6	4
АИХ	6	4
АИГ+ПБХ	4	3
Итого	143	100

Медиана возраста на момент обследования составила 14 лет [10; 17 лет]. Минимальный возраст – 5 лет, максимальный – 17 лет (Рисунок 6).

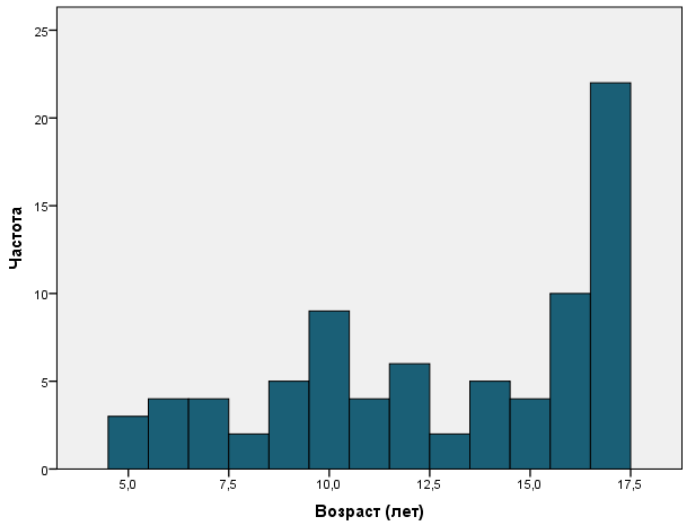


Рисунок 6 – Распределение обследованных пациентов по возрасту

Медиана возраста дебюта ХБП составила 8,5 лет [5; 11 лет]. Минимальный возраст дебюта – 1 год, максимальный – 16 лет (Рисунок 7).

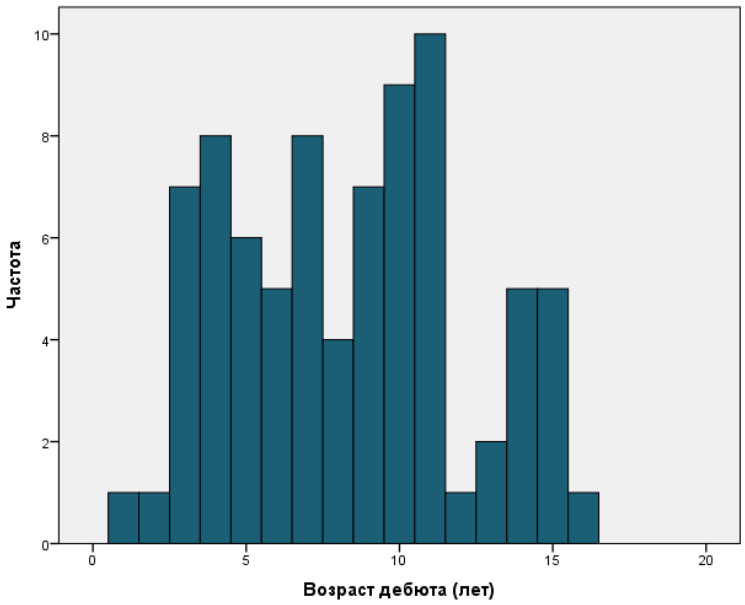


Рисунок 7 – Распределение пациентов в зависимости от возраста дебюта аутоиммунного заболевания печени

Длительность заболевания до верификации диагноза и назначения терапии составила в среднем 7 мес [2,25; 15,5] (Рисунок 8). Патогенетическую терапию назначали незамедлительно после верификации диагноза. Наиболее быстрый срок

установления диагноза с момента дебюта ХБП составил 1 мес, максимальный – 67 мес.

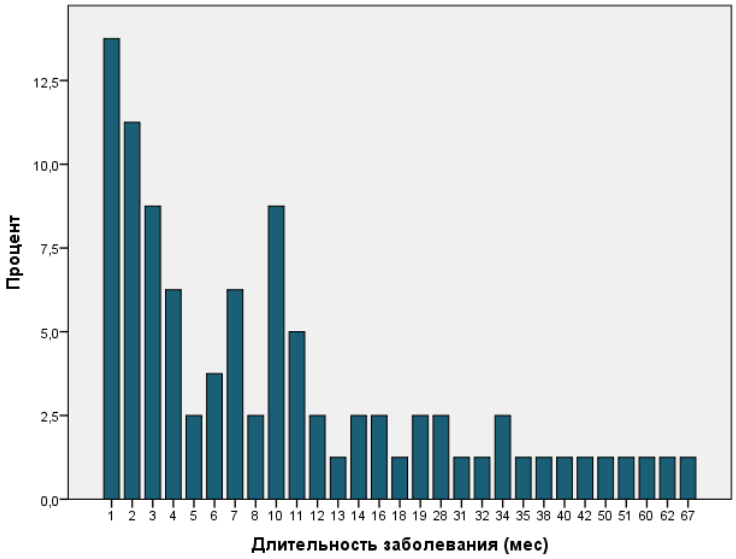


Рисунок 8 – Длительность заболевания (мес) до верификации диагноза и назначения терапии

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 9.

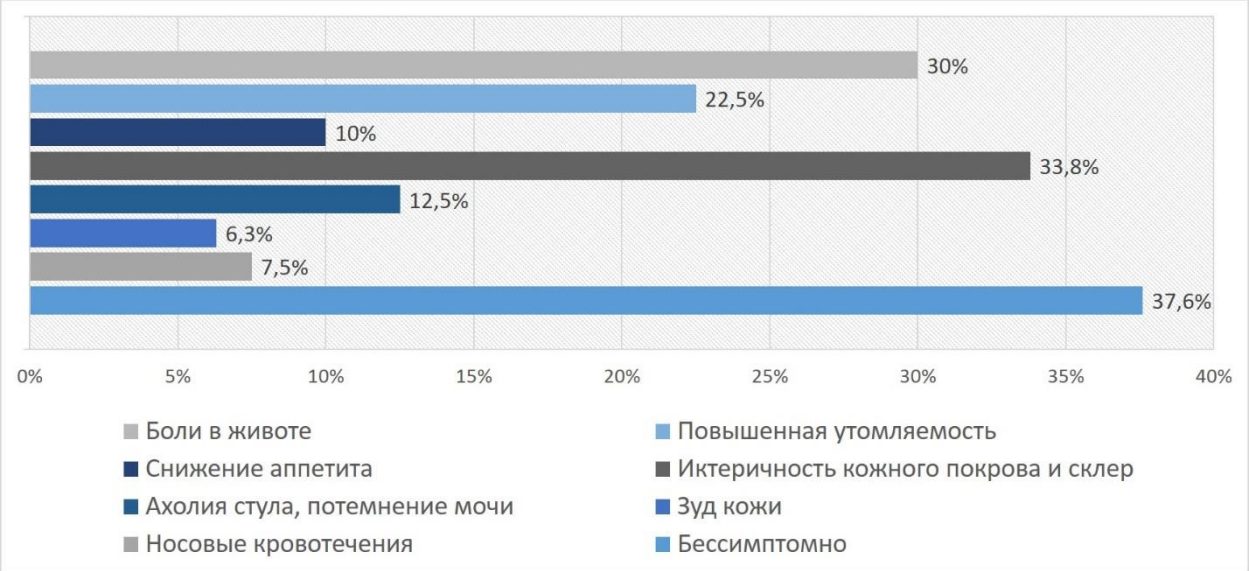


Рисунок 9 - Основные причины обследования детей в дебюте хронических болезней печени

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

Результаты лабораторного обследования детей на момент поступления в гастроэнтерологическое отделение с гепатологической группой НИИ педиатрии им. Г.Н. Сперанского ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России представлены в Таблицах 4-6.

Таблица 4 – Показатели клинического анализа крови у обследованных пациентов группы II на момент поступления (*n*=143)

Показатель	**Медиана**	**[Интерквартильный отрезок]**	**Min**	**Max**	**Норма**
Гемоглобин (г/л)	121,5	[106,3; 133,8]	81	162	110-147
Эритроциты (10^{12}/л)	4,6	[4,35; 4,91]	2,9	5,55	4-5,2
Лейкоциты (10^9/л)	5,8	[4,7; 7,3]	1,5	16,97	4,5-11,5
Лимфоциты (10^9/л)	2,3	[1,3; 3,0]	0,45	6,25	1,5-6,5
Нейтрофилы (10^9/л)	2,2	[1,7; 2,9]	0,5	12,86	1,1-5,8
Тромбоциты (10^9/л)	246	[153; 313]	56	492	150-440
СОЭ (мм/час)	14	[7; 24]	2	75	2-20

Как видно из представленных данных в Таблице 4, медианы показателей клинического анализа крови в среднем по группе сохранялись в пределах нормальных значений.

Таблица 5 – Показатели биохимического анализа крови у обследованных пациентов группы II на момент поступления (*n*=143)

Показатель	**Медиана**	**[Интерквартильный отрезок]**	**Min**	**Max**	**Норма**
АЛТ (МЕ/л)	117,6	[47,1; 282,8]	8,9	1388	<40
АСТ (МЕ/л)	95,9	[45,4; 205,7]	18,1	907	<42
ГГТ (МЕ/л)	33,4	[19,8; 77,8]	5,8	395	5-35
ЩФ (МЕ/л)	227,5	[143,5; 303,2]	46	1222	60-400
Билирубин общий (мкмоль/л)	17,8	[11,1; 26,8]	5,9	113	3,7-20,5
Билирубин прямой (мкмоль/л)	3,4	[2; 6,6]	0,6	66,1	<5,1
Глюкоза (ммоль/л)	4,3	[4,09; 4,42]	3,48	10,77	3,3-5,5
Общий белок (г/л)	77,1	[73,1; 82]	52,8	93,8	60-80
Альбумин (г/л)	40,1	[38,1; 42,5]	21,7	50,0	38-54
IgG (г/л)	16,8	[12,9; 24,8]	5,7	47,0	6,98 - 15,6
IgM (г/л)	1,5	[1,06; 2,05]	0,6	7,0	0,31 - 1,8
IgA (г/л)	1,4	[1,06; 1,95]	0,1	3,9	0,53 - 2,04
Лактат (ммоль/л)	2,1	[1,8; 2,8]	1,3	6,7	0,5 - 2,2
Аммиак (мкмоль/л)	44,7	[29,1; 61,7]	10	108	11 - 35
АФП (МЕд/мл)	2,2	[1,72; 3,2]	0,7	189,3	0 - 4,6

Как следует из Таблицы 5, в среднем по группе у пациентов отмечалось повышение сывороточных концентраций АЛТ, АСТ – как лабораторный признак поражения печени, и аммиака, как показатель нарушения детоксикационной функции печени.

Таблица 6 - Показатели свертывающей системы крови у обследованных пациентов группы II на момент поступления (*n*=143)

Показатель	**Медиана**	**[Интерквартильный отрезок]**	**Min**	**Max**	**Норма**
ПТИ (%)	76,0	[70,0; 86,0]	48	108	70-120
МНО (<>)	1,1	[1,04; 1,17]	0,91	1,5	0,87-1,2
ПТВ (сек)	14,3	[13,9; 15,5]	12,0	21,6	14-15,4
ТВ (сек)	17,0	[16,1; 17,8]	14,7	21,4	14-21
АЧТВ (сек)	34,5	[32,1; 37,1]	26,0	45,0	29,8-35,3
Фибриноген (г/л)	2,8	[2,43; 3,24]	1,52	5,9	1,99-4,09

Согласно данным Таблицы 6, в среднем в группе обследуемых детей медианы показателей свертывающей системы крови оставались в пределах референсных значений.

При дальнейшем анализе данных установлено, что стадия фиброза по данным морфологического исследования ассоциируется с изменениями клинико-лабораторных и инструментальных показателей (Таблица 7), 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).

Таблица 7 – Характер клинико-лабораторных, инструментальных и морфологических показателей у детей в группе II (n=143) со стадией ФП по шкале METAVIR

Показатель	**F1 (*n*=9)**	**F2 (*n*=17)**	**F3 (*n*=27)**	**F4 (*n*=27)**	**Уровень значимости различий**
Спленомегалия при пальпации	0/0	1/5,8%	4/14,8%	20/74%***	p_{F1-F4}**=0,036**
Тромбоциты, 10^9/л	301 [255; 332]	256 [221; 403]	246 [152; 309]	189*** [125; 259]	p_{F1-F4}**=0,001**
Спленомегалия по данным УЗИ	0/0	2/11,7%	6/22,2%	22/81,4%***	p_{F1-F4}**=0,001**
Расширение d воротной вены по УЗИ	0/0	1/5,8%	5/18,5%	22/81,4%***	p_{F1-F4}**=0,005**
Альбумин, г/л	43,2 [40,7; 44,3]	41,2 [39,1; 44,3]	40,6 [38,4; 42,3]	38,7*** [35,9; 40,6]	p_{F1-F4}**=0,029**
ПТИ, %	82,0 [74,0; 84,7]	84,0 [76,0; 93,0]	74,5 [70,0; 81,0]	71,5*** [62,0; 84,0]	p_{F1-F4}**=0,016**
Гистологическая активность по шкале Knodell	5 [4,3; 7]	7 [5; 9]	7 [6,5; 9]	11*** [9,8; 13]	p_{F1-F4}**=0,018**

Примечание. *** - различия статистически значимы между пациентами с минимальным ФП (F1) и ЦП (F4).

Таблица 8 – Взаимосвязи клинико-лабораторных, инструментальных и морфологических показателей у детей в группе II (n=143) со стадией ФП по шкале METAVIR

Показатель	**Спленомегалия при пальпации**	**Тромбоциты, 10^9/л**	**Спленомегалия по данным УЗИ**	**Расширение d воротной вены по УЗИ**	**Альбумин, г/л**	**ПТИ, %**	**Knodell**
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**

Выявленная положительная корреляция стадии фиброза со степенью гистологической активности по Knodell (Таблица 8) указывает на то, что интенсивность воспалительного процесса в печени приводит к усилению фибротических изменений.

ГЛАВА 4. ВАЛИДАЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭЛАСТОГРАФИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТАДИИ ФИБРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ

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

Распределение пациентов в зависимости от стадии фиброза представлено в Таблице 9.

Таблица 9 – Распределение обследованных пациентов по стадиям фиброза по METAVIR (*n*=135)

METAVIR, стадия	**Количество пациентов, абс.**	**Количество пациентов, отн.**
0	31	23
1	15	11
2	24	18
3	12	9
4	53	39
Итого	**135**	**100**

У обследованных пациентов преобладала стадия цирроза печени (F4 по METAVIR); выраженный фиброз печени был диагностирован у 9% детей, умеренный – у 18% и минимальный – у 11%; у остальных детей (23%) 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 10).

Таблица 10 – Показатели ТЭ с указанием интерквартильного отрезка у обследованных пациентов в зависимости от морфологической стадии фиброза по шкале METAVIR (*n*=135)

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 представлено на Рисунке 10. Как видно из представленных данных, среди 50 детей с АИГ фиброз отсутствовал лишь у 4 (8%) детей, у остальных 46 (92%) отмечались фибротические изменения различной степени выраженности. Преобладали выраженный фиброз (стадия F3 по METAVIR) и ЦП (F4) – обнаруженные у 37 (74%) детей.

Среди 14 детей с ПСХ фиброза не было диагностировано у 6 (42,9%) человек, при этом стадии F1 и F3 в данной группе детей представлены не были. Умеренный фиброз (F2) наблюдался у 5 (35,7%) детей, ЦП (F4) – у 3 (21,4%) детей.

При БВ фиброза не наблюдалось у 9 (24,3%) из 37 детей, а у 4 (10,8%) пациентов отмечался минимальный фиброз F1. Умеренный фиброз F2 диагностирован у 6 (16,2%) детей, выраженный фиброз (F3) – у 3 (8,1%) детей, ЦП (F4) – у 15 (40,6%) пациентов.

Среди 34 пациентов с ХГВ и ХГС фиброз отсутствовал у 12 (35,3%) пациентов, слабый фиброз (F1) диагностирован – у 8 (23,5%) детей, умеренный

фиброз (F2) – у 7 (20,6%) человек. Выраженный фиброз (F3) верифицирован у 2 (5,9%) детей, ЦП (F4) – у 5 (14,7%) пациентов.

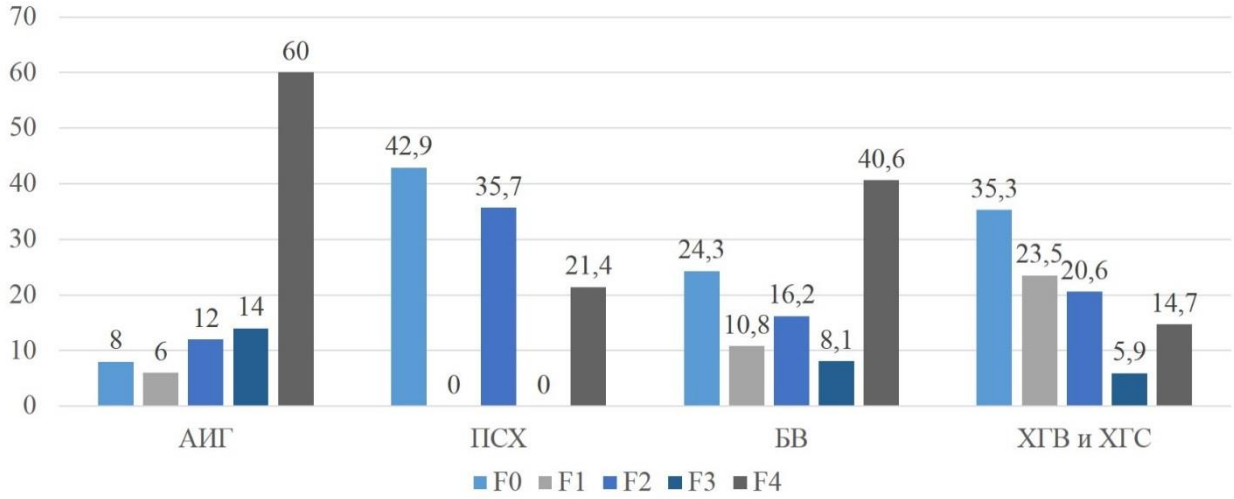
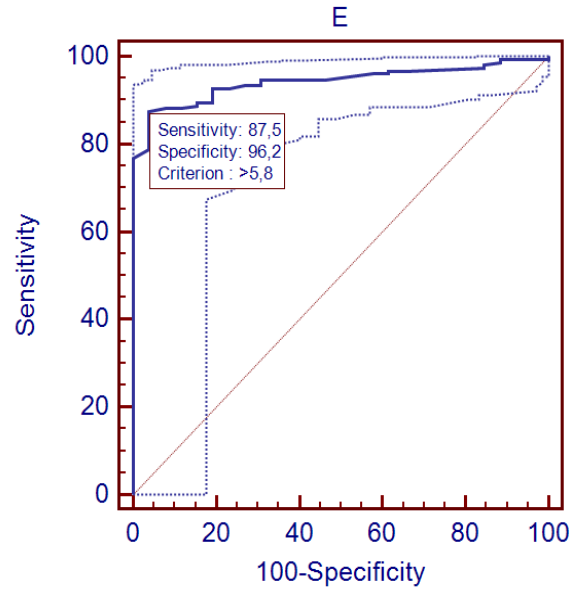


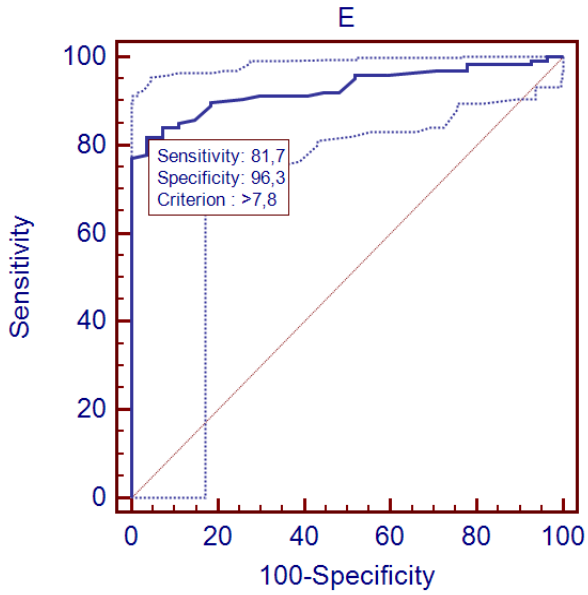
Рисунок 10 – Распределение стадий ФП у детей с разными нозологическими формами ХБП. Значения представлены в виде %

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

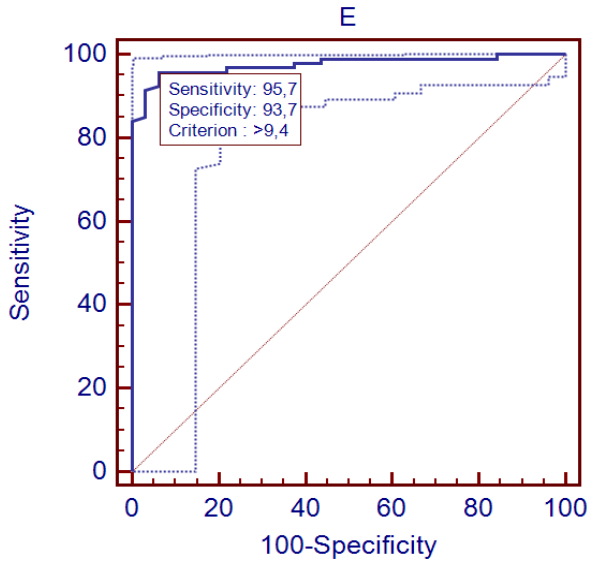
При оценке методом ROC-анализа оптимальные значения для диагностики слабого (F1) и умеренного (F2) фиброза составили >5,8 кПа и >7,8 кПа (Рисунок 11А-Б), для выраженного фиброза (F3) и цирроза (F4) >9,4 кПа и >12,7 кПа, соответственно (Рисунок 11В-Г), с AUROC 0,943 [0,909-0,976], 0,928 [0,888-0,968], 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 11).



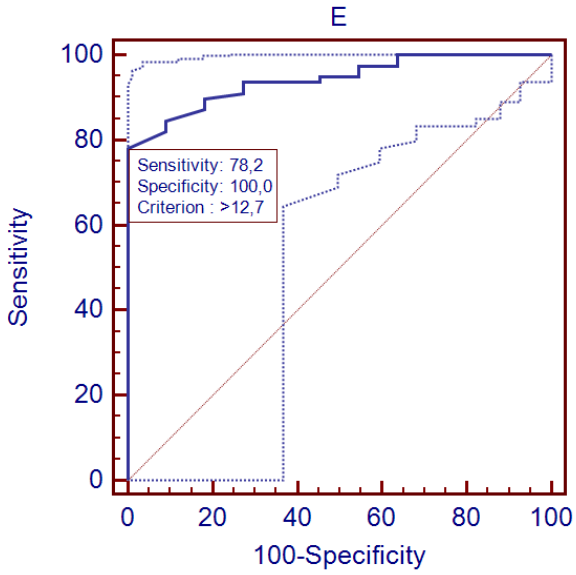
А



Б



В



Г

Рисунок 11А-Г – ROC-кривые, характеризующие зависимость вероятности стадии ФП по шкале METAVIR от плотности печени по данным ТЭ, выраженной в кПа, у детей с ХБП. А – для диагностики минимального ФП (F1); Б – для диагностики умеренного ФП (F2); В – для диагностики выраженного ФП (F3); Г – для диагностики ЦП (F4)

Таблица 11 – Оптимальные значения транзиентной эластографии для диагностики фиброза при хронических болезнях печени у детей (*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.

ГЛАВА 5. СЫВОРОТОЧНОЕ И ТКАНЕВОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРЯМЫХ БИОМАРКЕРОВ ФИБРОЗИРОВАНИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЯХ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ

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

В зависимости от гистологической стадии ФП, оцененной по шкале METAVIR, пациенты 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 (Рисунок 12).

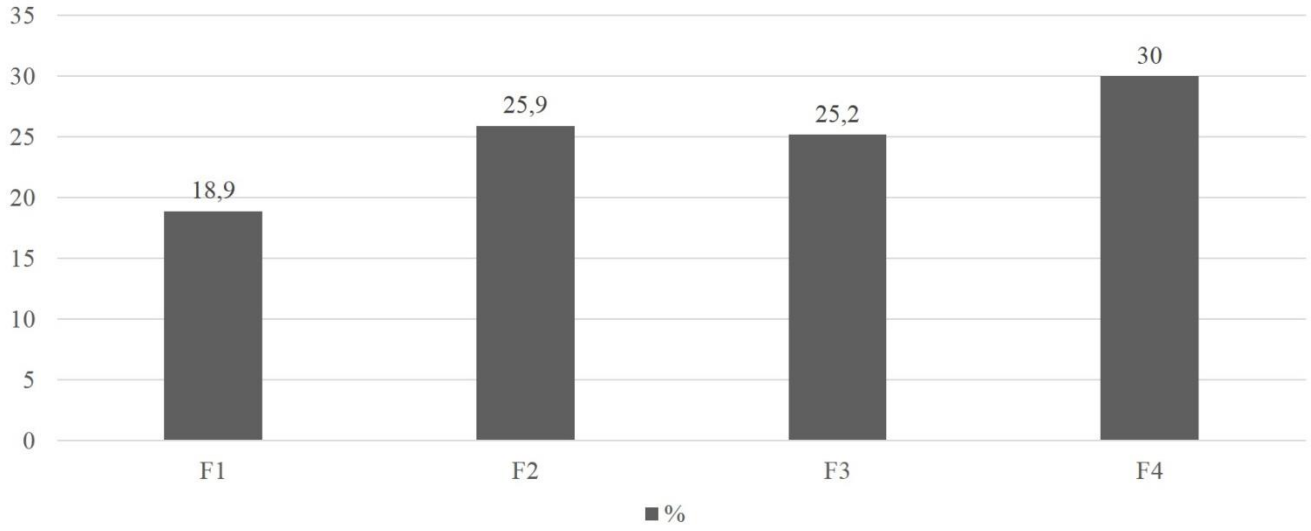


Рисунок 12 – Распределение обследованных пациентов в зависимости от стадии ФП по шкале METAVIR

Результаты иммуноферментного анализа образцов сывороток пациентов позволили выявить определенные изменения концентраций исследуемых биомаркеров в сыворотке крови при различных стадиях ФП (Таблица 12).

Таблица 12 – Концентрации К-I, -III, -IV и ГК в сыворотке крови у детей (*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.

Сывороточные концентрации К-I при стадии F1 составили 149,0 [83,9; 238,0], при стадии F2 – 109,5 [56,2; 151,9], при стадии F3 – 113,4 [83,2; 156,7], при стадии F4 – 87,1 [45,2; 108,0] нг/мл (Рисунок 13).

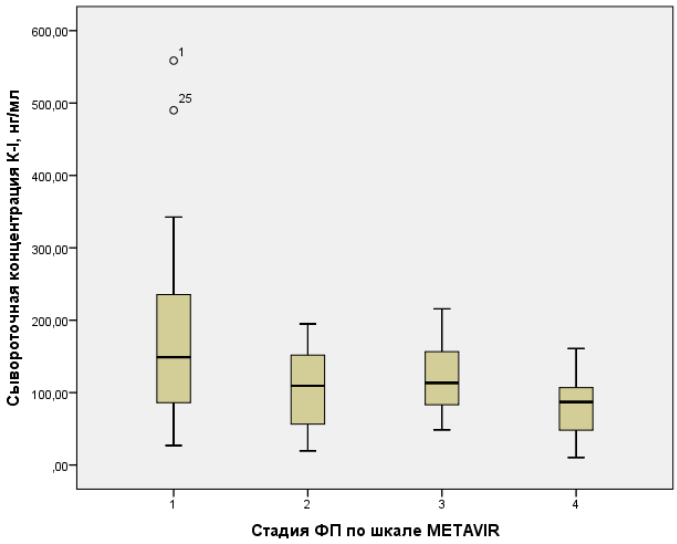


Рисунок 13 – Концентрация К-I в сыворотке крови при различных стадиях ФП у детей с ХБП

Содержание К-IV в сыворотке крови при стадии F1 было 7,8 [1,92; 18,2], при стадии F2 – 17,3 [11,7; 26,4], при стадии F3 – 18,2 [6,3; 32,9], при стадии F4 – 39,04 [15,3; 90,6] нг/мл (Рисунок 14).

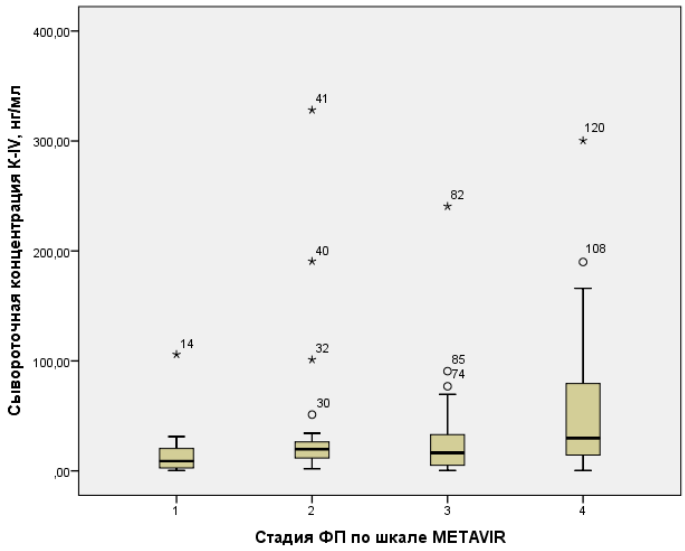


Рисунок 14 – Концентрация К-IV в сыворотке крови при различных стадиях ФП у детей с ХБП

Концентрация ГК в сыворотке крови имела значения при F1 – 26,9 [21,9; 33,5], при стадии F2 – 28,9 [25,7; 37,1], при стадии F3 – 37,4 [29,20; 51,1], при стадии F4 – 94,7 [40,75; 173,0] нг/мл (Рисунок 15).

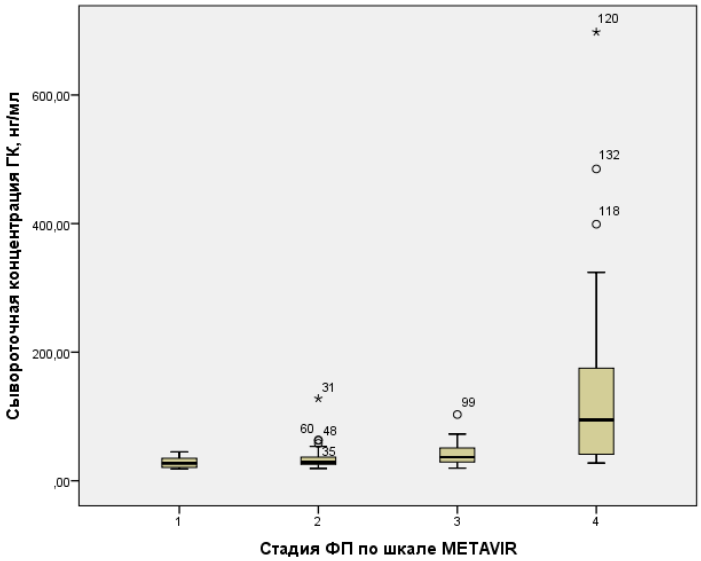


Рисунок 15 – Концентрация ГК в сыворотке крови при различных стадиях ФП у детей с ХБП

Как видно из данных, представленных в Таблице 12, 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).

Также отмечена тенденция к повышению содержания К-III в сыворотке крови на начальных стадиях ФП и, напротив, к снижению при циррозе, однако данные, согласно критерию Краскела-Уоллиса, оказались статистически не значимыми (p=0,559).

Ниже представлен фрагмент корреляционной матрицы (Таблица 13), который доказывает наличие определенных связей между содержанием исследуемых биомаркеров в сыворотке крови и выраженностью структурных изменений печени по данным морфологического исследования гепатобиоптатов.

Таблица 13 – Результаты корреляционного анализа по методу Спирмена

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***

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. Выявленные изменения могут указывать на особенности фиброзирования печени у детей при хронической прогрессирующей патологии, а именно на изменение количественного состава экстрацеллюлярного матрикса, 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.

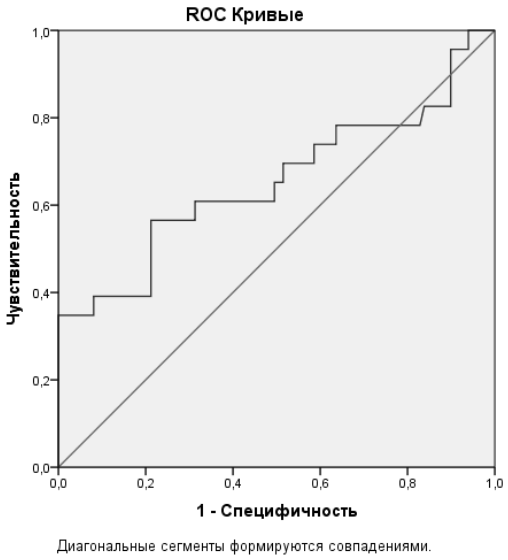


Рисунок 16 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности стадии ФП по шкале METAVIR от сывороточной концентрации К-I у детей с ХБП – для разграничения незначительного ФП (F1) и стадий выраженного ФП (F2-F4).

Площадь по ROC-кривой (Рисунок 16), 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.

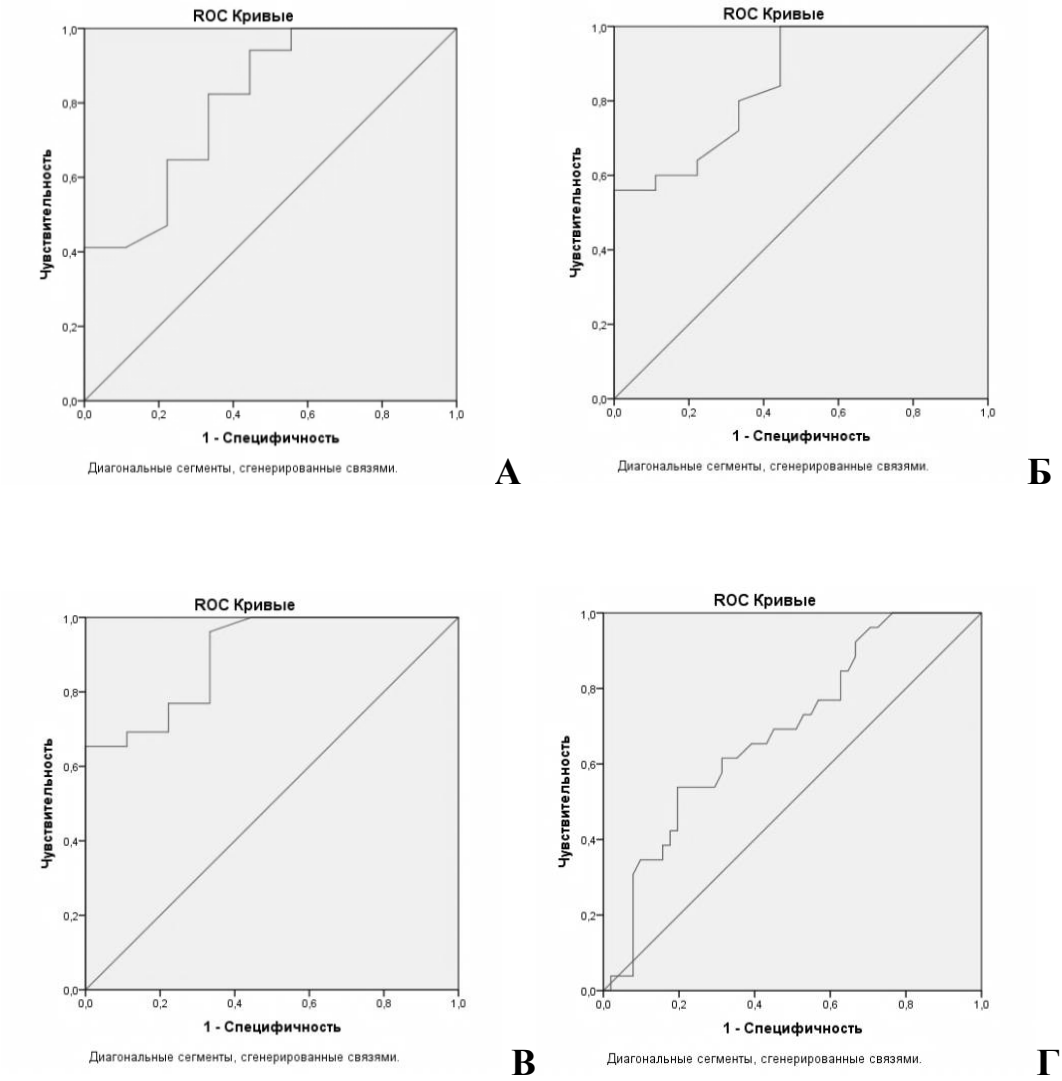


Рисунок 17А-Г – ROC-кривые, характеризующие зависимость вероятности стадии ФП по шкале METAVIR от сывороточной концентрации К-IV. А – для разграничения незначительного (F1) и умеренного (F2) ФП; незначительного (F1) и значительного (F3) ФП; незначительного (F1) ФП и ЦП (F4); не ЦП и ЦП у детей с ХБП

Площадь под ROC-кривой (Рисунок 17А), 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 (Рисунок 17Б), соответствующая взаимосвязи концентрации К-IV со стадией ФП, составила для разграничения незначительного (F1) и значительного (F3) ФП – 0,851±0,072 с 95% ДИ: 0,710-0,992. Полученная модель была статистически значимой (p=0,002). Пороговое значение К-IV в точке cut-off равно 12,03 нг/мл. При концентрации исследуемого биомаркера в сыворотке крови равном или превышающем данное значение прогнозировался риск выраженного ФП (F3), но не F1. Чувствительность и специфичность метода составили 80,0% и 66,7%, соответственно.

Площадь под ROC-кривой (Рисунок 17В), соответствующая взаимосвязи концентрации К-IV со стадией ФП, составила для разграничения незначительного ФП (F1) и ЦП (F4) – 0,900±0,057 с 95% ДИ: 0,788-1,00. Полученная модель была статистически значимой (p=0,001). Пороговое значение К-IV в точке cut-off равно 12,03 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 96,2% и 66,7%, соответственно.

Площадь под ROC-кривой (Рисунок 17Г), 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.

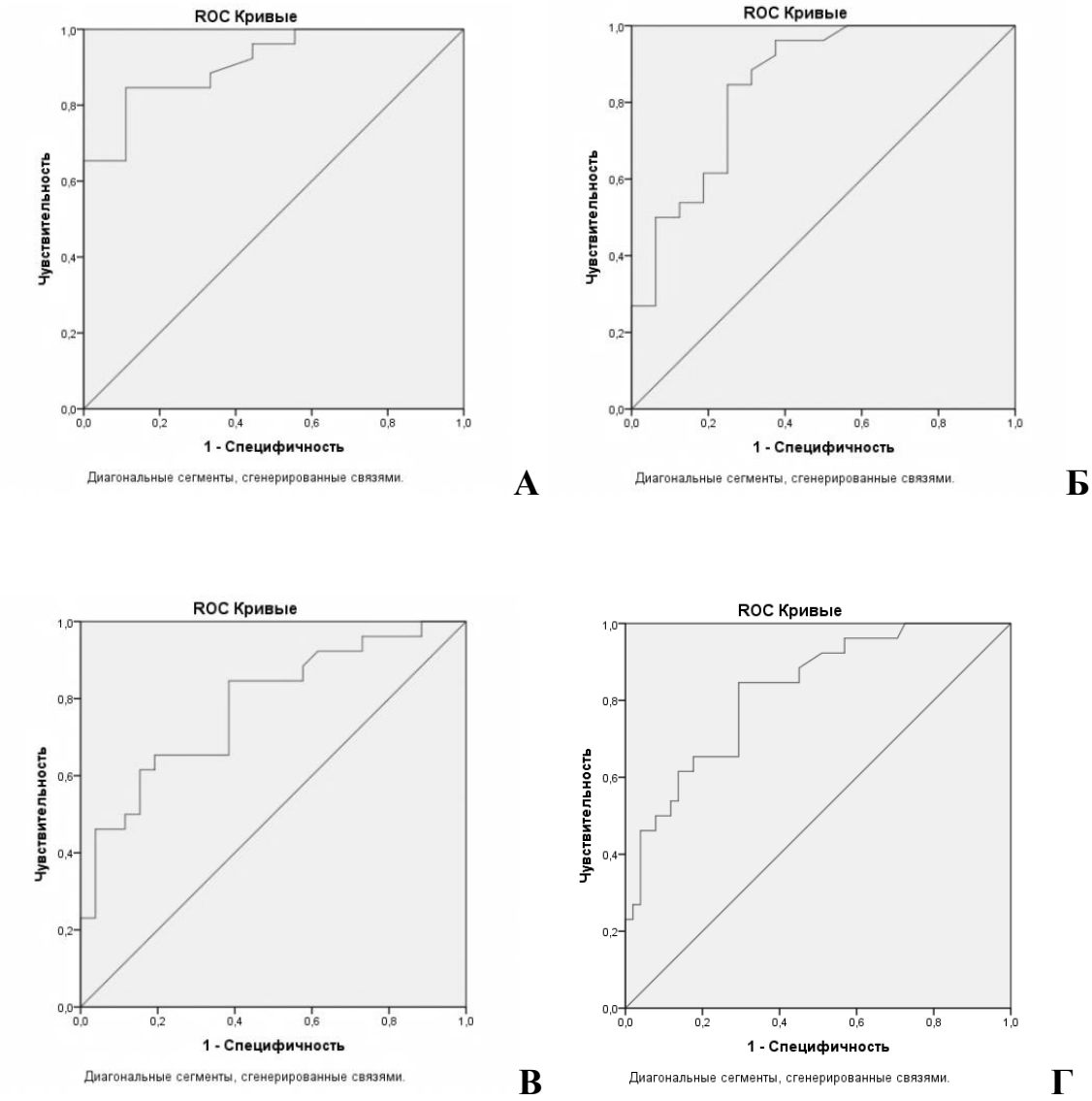


Рисунок 18А-Г – ROC-кривые, характеризующие зависимость вероятности стадии ФП по шкале METAVIR от сывороточной концентрации ГК. А – для разграничения незначительного ФП (F1) и ЦП (F4); умеренного ФП (F2) и ЦП (F4); выраженного ФП (F3) и ЦП (F4); не ЦП и ЦП у детей с ХБП

Площадь под ROC-кривой (Рисунок 18А), 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 (Рисунок 18Б), 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 (Рисунок 18В), 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 (Рисунок 18Г), 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.

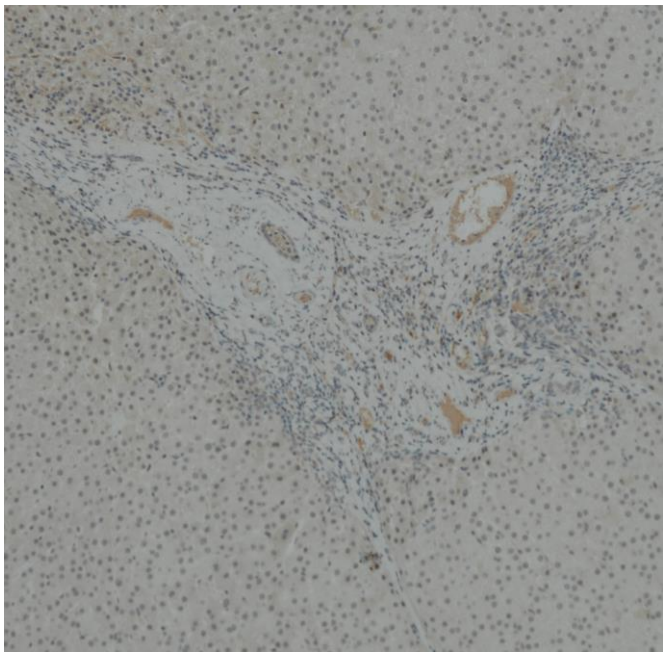
5.2. Характеристика отложения коллагенов различных типов в ткани печени в зависимости от стадии фиброза

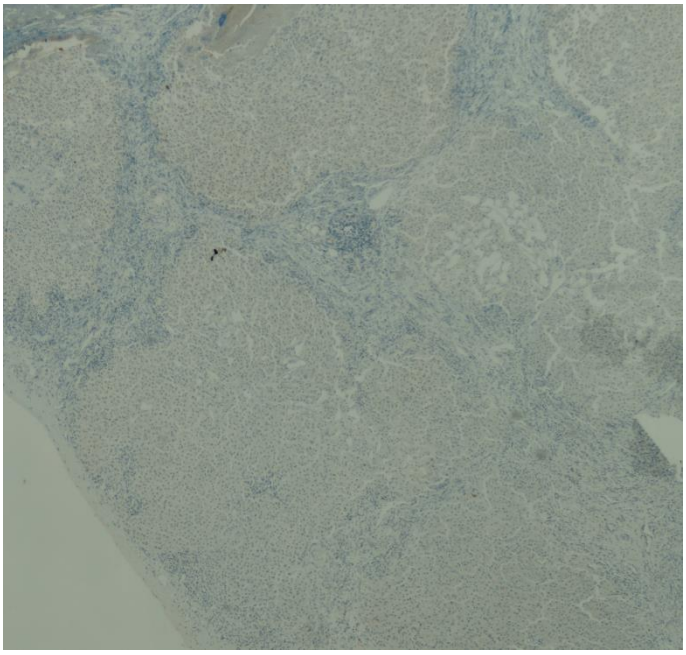
На следующем этапе нами было оценено содержание коллагенов различных типов – К-I, К-III, К-IV (основных компонентов ЭЦМ) в ткани печени методом подсчета пропорциональной площади у 61 пациента с ХБП, включенных в группу II (проспективная часть исследования). Распределение обследованных пациентов по стадиям ФП представлено в Таблице 14.

Таблица 14 – Распределение обследованных пациентов по стадиям фиброза по 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 19А), 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 19Б). Это может быть обсуловлено тем, что К-I, составляющий основу соединительнотканного матрикса здоровой печени, замещается патологическими формами коллагена при хронической патологии органа.



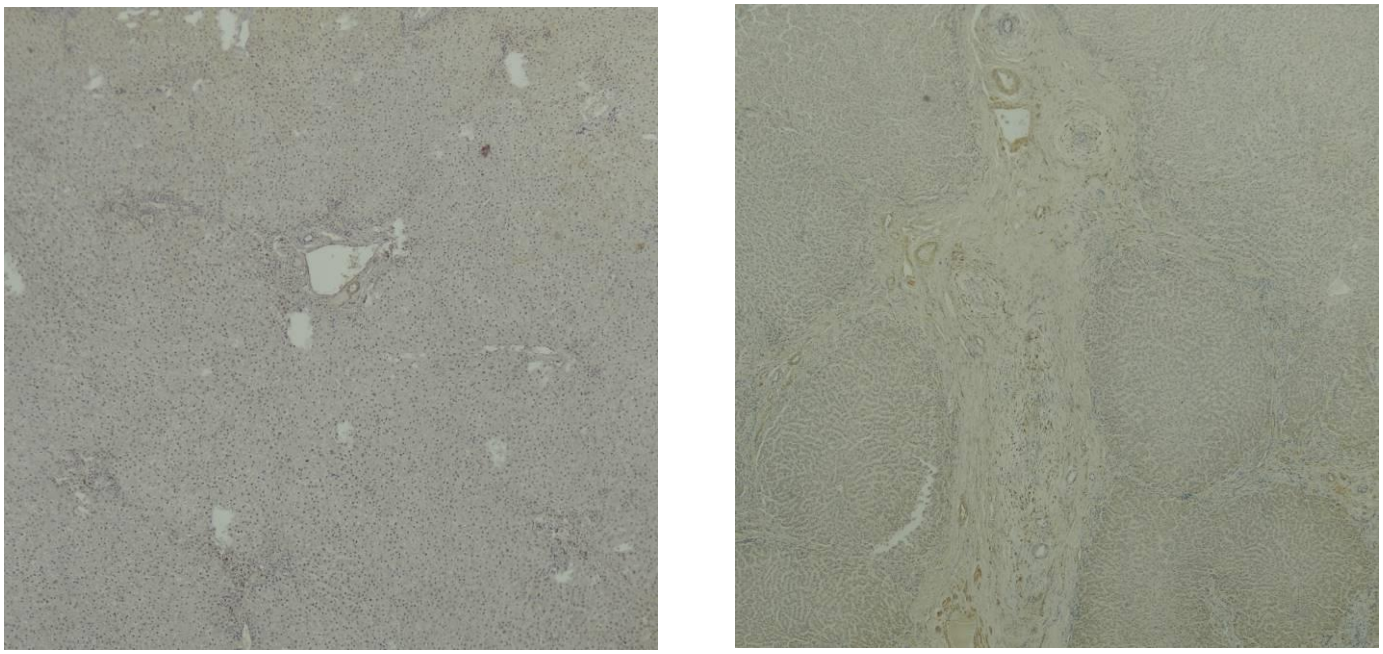


А **Б**

Рисунок 19А-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 20А-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).

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 15, Рисунок 20).



А **Б**

Рисунок 20А-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

Таблица 15 – 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**				$p_{К\text{-}У}$
	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. $p_{К\text{-}У}$ – уровень статистической значимости согласно критерию Краскела-Уоллиса.

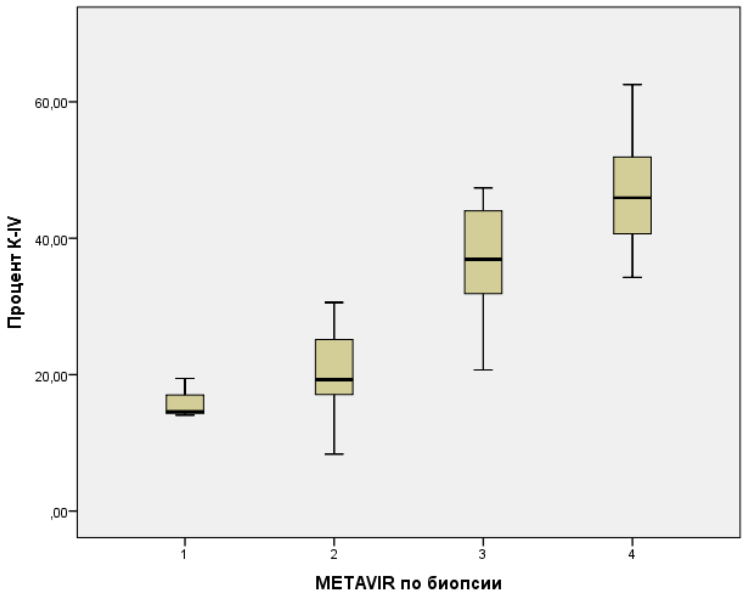


Рисунок 21 – Распределение значений пропорциональной площади К-IV (*n*=61), выраженной в процентах, при различных стадиях ФП

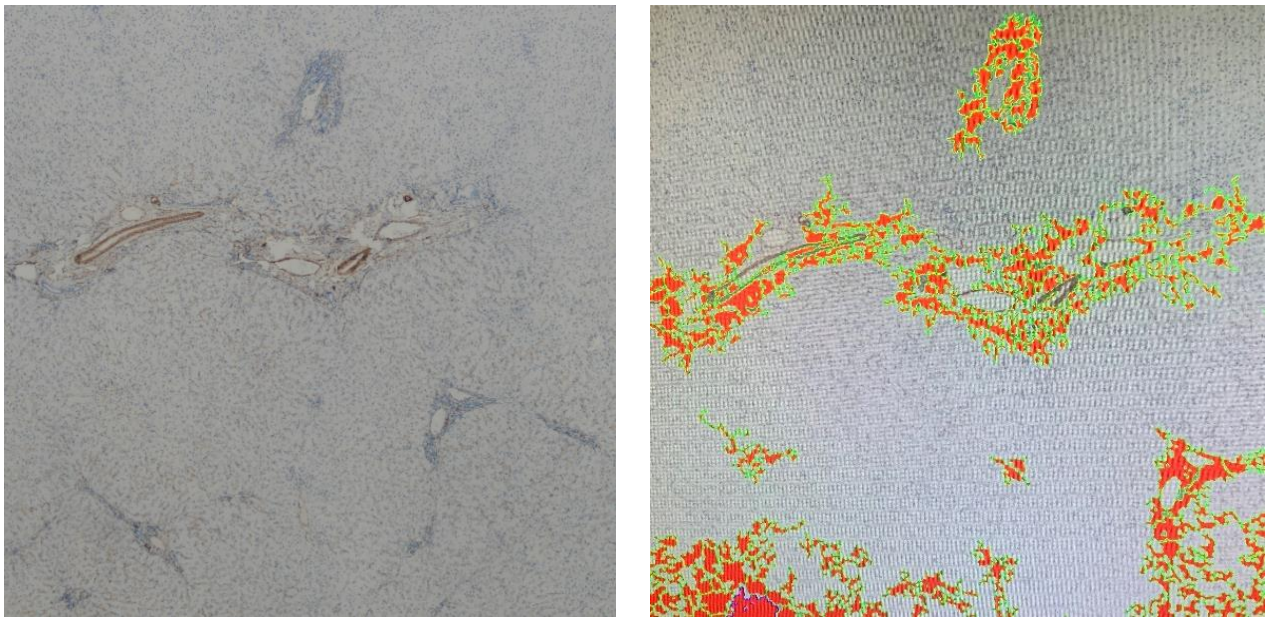
Также были подсчитаны значения площади К-IV в абсолютных числах (нм^2). Результаты представлены в Таблице 16 и на Рисунке 21. При этом общая площадь оцениваемого участка ткани печени составила 3521709,75 нм^2.

Таблица 16 – Площадь К-IV у детей группы II (*n*=61) при различных стадиях ФП, выраженная в нм^2

Биомаркер	**Стадия фиброза по шкале METAVIR**				$p_{К\text{-}У}$
	F1 (n=5)	*F2 (n=17)*	*F3 (n=20)*	*F4 (n=19)*	
К-IV (нм^2)	514169,6 [504484,9; 599394,9] min 494800,2 max 684620,4	678281,3 [602036,3; 885357,8] min 294062,8 max 1076938,8	1300215,2 [1122368,9; 1549904,5] min 728641,8 max 1668233,9	1617521,3 [1431927,2; 1827767,4] min 1206185,6 max 2201772,9	**0,009**

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

При минимальном ФП (F1 по METAVIR) отложение К-IV наблюдается вдоль портальных трактов (Рисунок 22А-Б).



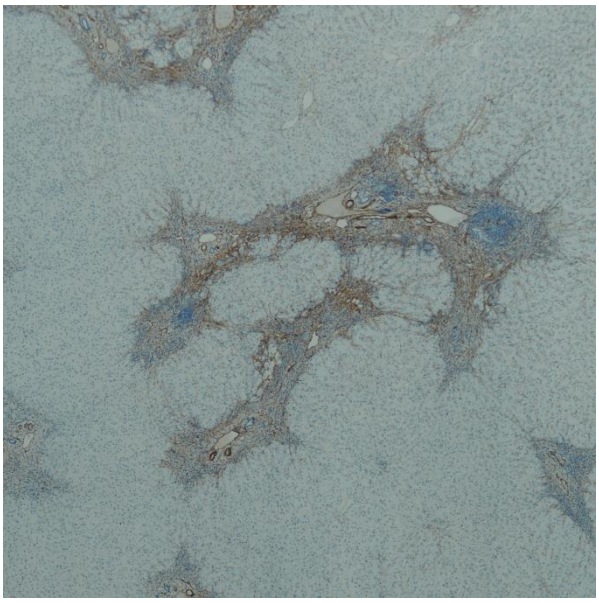
А **Б**

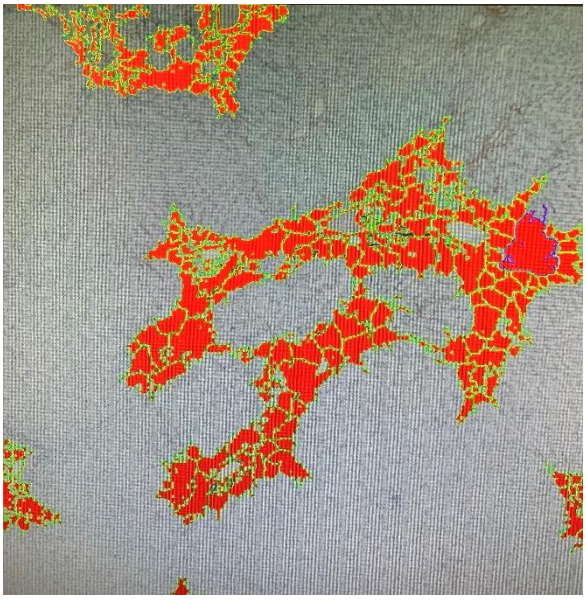
Рисунок 22А-Б – Особенности отложения К-IV при минимальном ФП (F1 по METAVIR). А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV, увеличение 4х; Б – подсчет площади отложения К-IV по отношению к общей площади ткани печени

В случае умеренного ФП (F2 по METAVIR) К-IV откладывается в портальных трактах и по ходу порто-портальных септ (Рисунок 23А-Б).

При выраженном ФП (F3) накопление К-IV отмечается вдоль портальных трактов, по ходу множественных формирующихся порто-портальных и портоцентральных септ (Рисунок 24А-Б).

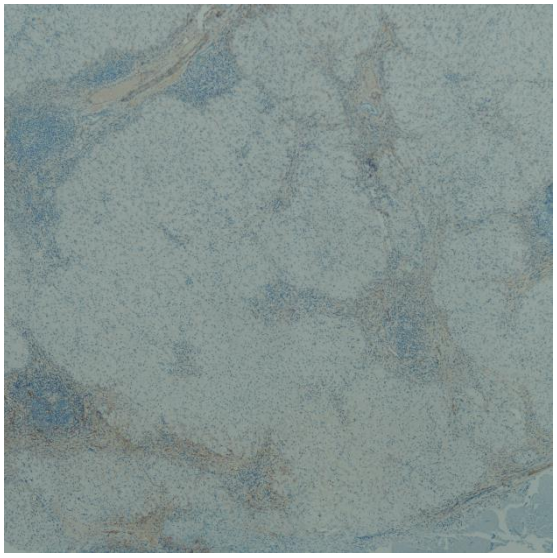
При сформированном ЦП К-IV составляет значительную площадь ткани печени – более 50%, выстилая полностью сформированные ложные дольки (Рисунок 25А-Б).

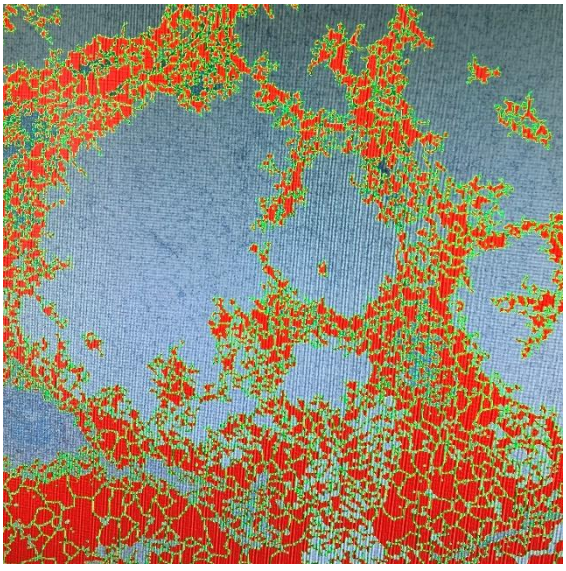




А **Б**

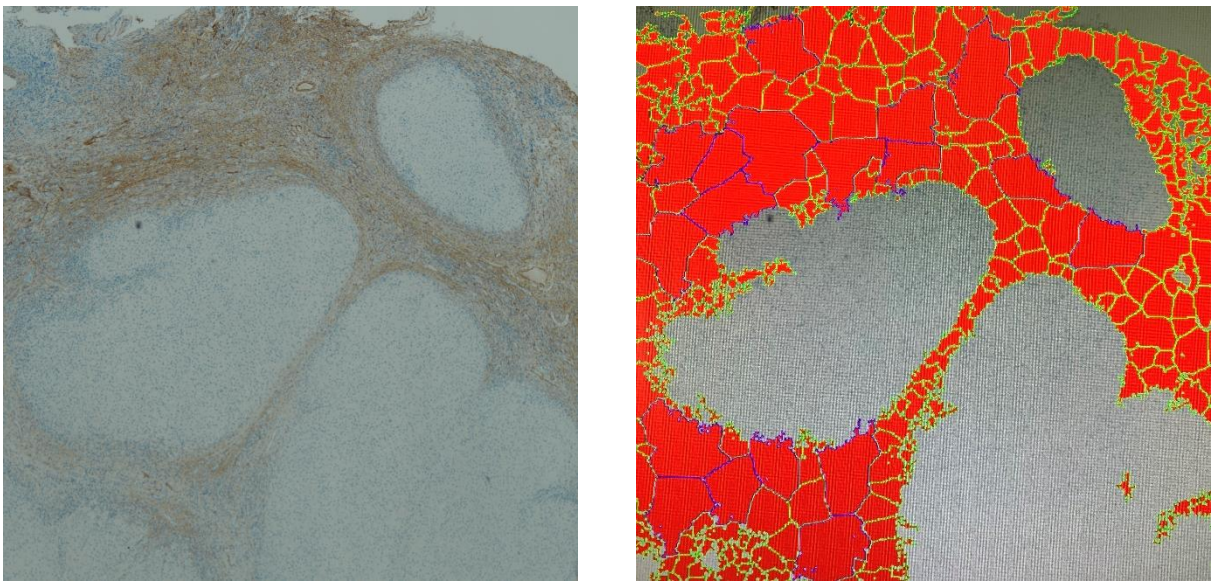
Рисунок 23А-Б – Особенности отложения К-IV при умеренном ФП (F2 по METAVIR). А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV, увеличение 4х; Б – подсчет площади отложения К-IV по отношению к общей площади ткани печени





А **Б**

Рисунок 24А-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



А **Б**

Рисунок 25А-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

5.3. 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 17).

Таблица 17 – Корреляции сывороточной концентрации К-IV со стадией фиброза по 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**

5.4. 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).

Таблица 18 – Прогностические модели для диагностики начальных стадий ФП и ЦП с использованием значением сывороточных концентраций К-I, ГК и значений 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).

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 18.

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 р – 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%.

5.5. 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 26).



Рисунок 26 – Алгоритм диагностики и динамического мониторинга ФП

ГЛАВА 6. КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ

6.1. Клинический случай № 1

Особенности диагностики стадии фиброза печени у ребенка 10 лет с дебютом аутоиммунного гепатита 1 типа

Девочка С., 10 лет.

Из анамнеза известно, что ребенок от 1-й беременности, 1-х самостоятельных родов в срок. Масса тела при рождении – 3000 г, рост – 50 см. Грудное вскармливание до 1-й недели жизни, далее искусственное. Физическое и нервно-психическое развитие соответствовало средневозрастным нормам. Вакцинирована согласно национальному календарю.

В возрасте 10 лет у девочки появились жалобы на общую слабость, повышенную утомляемость, иктеричность склер и кожных покровов, по поводу чего была госпитализирована в стационар по месту жительства. По результатам лабораторного обследования выявлены синдром цитолиза высокой степени активности (АЛТ 1595 МЕ/л, АСТ 1503 МЕ/л), синдром холестаза (общий билирубин 125.1 мкмоль/л, прямой билирубин 78.8 мкмоль/л, щелочная фосфатаза 717 МЕ/л, ГГТ 75 МЕ/л), гиперпротеинемия (общий белок 104 г/л). Были исключены вирусные гепатиты: anti-HAV IgG отрицательно, anti-HAV IgM отрицательно, anti-HCV отрицательно, HBsAg отрицательно. С целью верификации диагноза и выработки тактики дальнейшего лечения ребенок направлен в гастроэнтерологическое отделение с гепатологической группой ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

При поступлении состояние расценено как средней тяжести. Масса тела – 36 кг, рост – 146 см, физическое развитие среднее, гармоничное (SDS роста 0,74; SDS веса 0,42; BMI 17,60 кг/м2; BMI SDS 0,24). Кожные покровы бледно-розовые, слизистые оболочки бледно-розовые, без высыпаний, краевая иктеричность склер. Носовое дыхание свободное. При аускультации легких дыхание везикулярное,

проводится во все отделы, хрипов нет. ЧД 20 в мин. ЧСС 78 в минуту, АД 95/55 мм рт. ст. Живот визуально не увеличен. Печень пальпируется у края правой реберной дуги, селезенка не пальпируется. Стул самостоятельный, оформленный, без примесей, окрашен. Дизурии нет, моча светло-желтого цвета, периферических отеков нет.

Проведено комплексное лабораторное и инструментальное обследование, по результатам которого у ребенка выявлены синдромы цитолиза и холестаза, гиперпротеинемия при нормальной сывороточной концентрации альбумина, гипергаммаглобулинемия (Таблица 19).

Таблица 19 – Показатели биохимического анализа крови пациентки С. при поступлении.

Показатель	**Значение**	**Норма**
АЛТ (МЕ/л)	**1388**	<40
АСТ (МЕ/л)	**907**	<42
ГГТ (МЕ/л)	**49**	5-35
ЩФ (МЕ/л)	232	60-400
Билирубин общий (мкмоль/л)	19,64	3,7-20,5
Билирубин прямой (мкмоль/л)	**6,47**	<5,1
Глюкоза (ммоль/л)	4,15	3,3-5,5
Общий белок (г/л)	**93,7**	60-80
Альбумин (г/л)	39,7	38-54
IgG (г/л)	**47,0**	6,98 - 15,6
IgM (г/л)	1,79	0,31 - 1,8
IgA (г/л)	1,7	0,53 - 2,04
Лактат (ммоль/л)	2,1	0,5 - 2,2

Аммиак (мкмоль/л)	**36,8**	11 - 35
АФП (МЕд/мл)	1,9	0 - 3,1

Таким образом, анемия и цитопения у ребенка отсутствовали, СОЭ была повышена до 26 мм/час. Ребенку исключены БВ (церулоплазмин 48 мг/дл – сывороточная концентрация соответствует норме), альфа-1-антитрипсиновая недостаточность (альфа-1-антитрипсин 163 мг/дл – сывороточная концентрация соответствует норме). Показатели коагулограммы – без отклонений от референсных значений (ПТИ 90%, ПТВ 14 сек, ТВ 20,5 сек, МНО 1,06, АЧТВ 28,9, фибриноген 2,57 г/л).

Был оценен титр печеночноспецифических аутоантител: антинуклеарный фактор (АНФ) 1:2560 (норма <1:160), антитела к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) IgG 1:320 (норма <1:40), антитела к гладкой мускулатуре (ASMA) 1:2560 (норма <1:40), антитела к микросомам печени и почек (anti-LKM1) <1:40 (норма <1:40), антимитохондриальные антитела (АМА) <1:40 (норма <1:40).

По данным УЗИ органов брюшной полости паренхима печени диффузно неоднородная, повышенной эхогенности, сосудистый рисунок усилен, стенки сосудов уплотнены, преимущественно мелких ветвей с формированием мелко-сетчатого рисунка, селезенка увеличена, размерами 125х61 мм. Выполнена транзиентная эластография печени: при проведении серии измерений в правой доле печени медиана плотности составила 16,9 кПа (выраженно повышена). Колебания показателей эластичности в отдельных измерениях от 13,1 до 26,1 кПа; IQR 7,6; S.rate 100 %. Заключение: результаты могут соответствовать циррозу (F4 по шкале METAVIR). По данным МРТ органов брюшной полости (Рисунок 27) паренхима печени диффузно неоднородная, с выраженным периваскулярным фиброзом, без очаговых/объемных изменений. Селезенка увеличена, косовертикальным размером до 135 мм, контуры ровные, четкие, паренхима однородная. По данным магнитно-резонансной холангиопанкреатографии внутри- и внепеченочные желчные протоки не расширены, контуры ровные, четкие – данный за склерозирующий холангит крупных желчных протоков нет. По данным

эзофагогастродуоденоскопии признаков варикозного расширения вен пищевода и желудка нет.

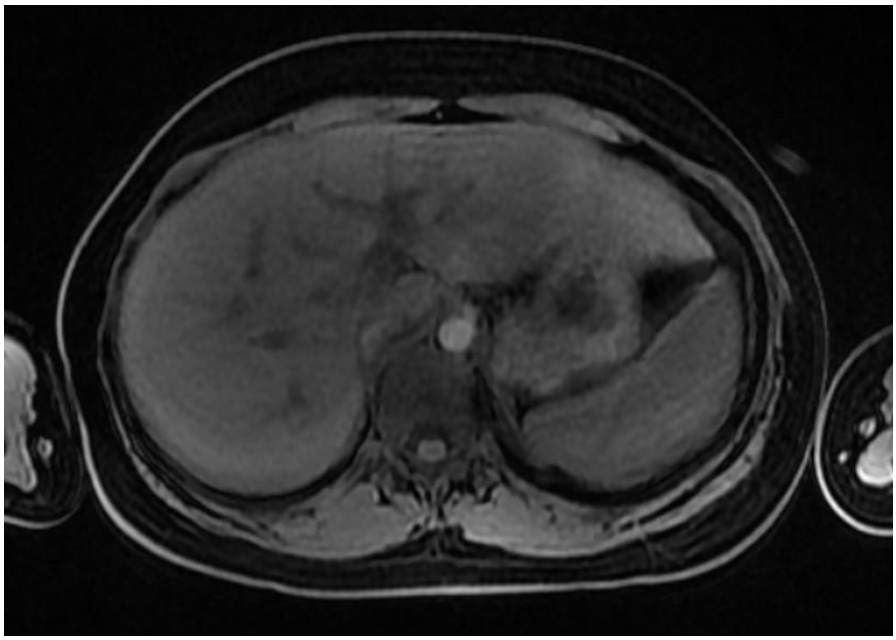
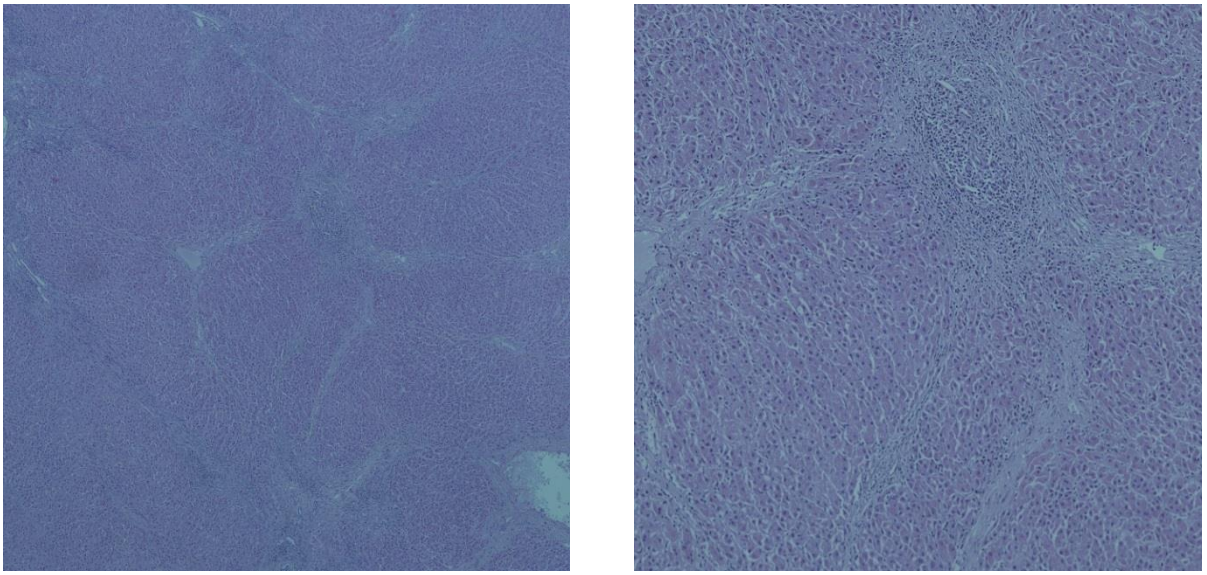


Рисунок 27 – МРТ органов брюшной полости ребенка С.: признаки диффузных паренхиматозных изменений печени, спленомегалия.

Пациентке выполнена краевая резекция ткани печени под лапароскопическим контролем. Парафиновые срезы образцов тканей толщиной 5 мкм монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизином. Для определения экспрессии белков применяли антитела к К-I, К-III и К-IV. В день выполнения биопсии печени натощак проведено взятие венозной крови из локтевой вены и методом иммуноферментного анализа определено содержание К-I, К-III, К-IV и ГК в сыворотке крови.

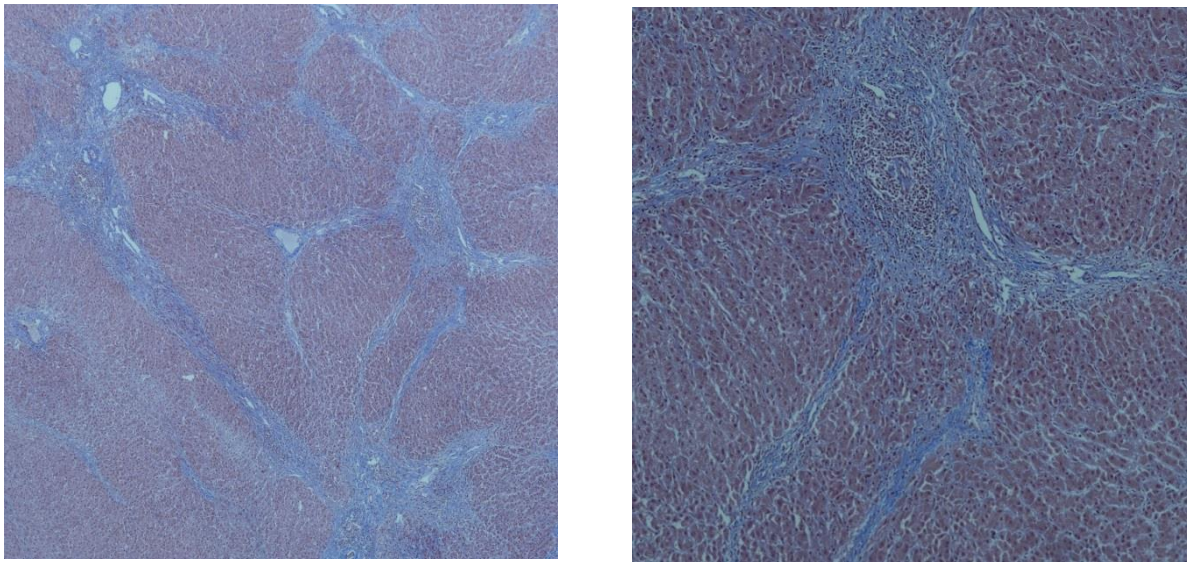
При морфологическом исследовании гепатобиоптата выявлены следующие изменения: капсула с умеренным разрастанием соединительной ткани. В портальных трактах выраженная инфильтрация с CD3 позитивными лимфоцитами и макрофагами (CD68), видны единичные плазматические клетки (CD138). Отмечается формирование фолликулоподобных структур, в центре которых – желчные протоки с вакуолизированным эпителием. Воспалительный инфильтрат проникает в дольку на небольших участках (Рисунок 28А-Б).

Портальные тракты расширены, склерозированы с полными порто-портальными и порто-центральными септами, отмечается формирование ложных долек (Рисунок 29А-Б). Выраженная пролиферация желчных протоков в портальных трактах, септах и проникая в дольки (интенсивность реакции СК7 и СК19 практически одинаковая). Гепатоциты разного размера, отмечаются крупные многоядерные клетки. Цитоплазма гепатоцитов мелкозернистая. В клетках видны мелкие и средние вакуоли. Часть гепатоцитов замурована в перипортальных зонах. Малочисленные фокусы моноцеллюлярного некроза. Перигепатоцеллюлярный склероз в перипортальной и перицентральных участках. В единичных гепатоцитах отмечается накопление коричневого пигмента. Гепатоциты накапливают PAS-позитивное вещество, которое полностью вымывается при обработке амилазой. В синусоидах видна пролиферация купферовских клеток. Реакция Перлса и качественная реакция на медь отрицательная. Хронический перипортальный гепатит низкой степени гистологической активности Knodell 5 (I-B, II-C, III-B). Индекс фиброза по Desmet 4 балла (цирроз), по METAVIR – A1 (pmn-1, ln-1), F4.



А **Б**

Рисунок 28А-Б – Морфологические изменения печени пациентки С.: в портальных трактах выраженная лимфо-плазмоцитарная инфильтрация, воспалительный инфильтрат проникает в дольку. Отмечается формирование фолликулоподобных структур, в центре которых – желчные протоки с вакуолизированным эпителием. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 4х (А), увеличение 10х (Б).



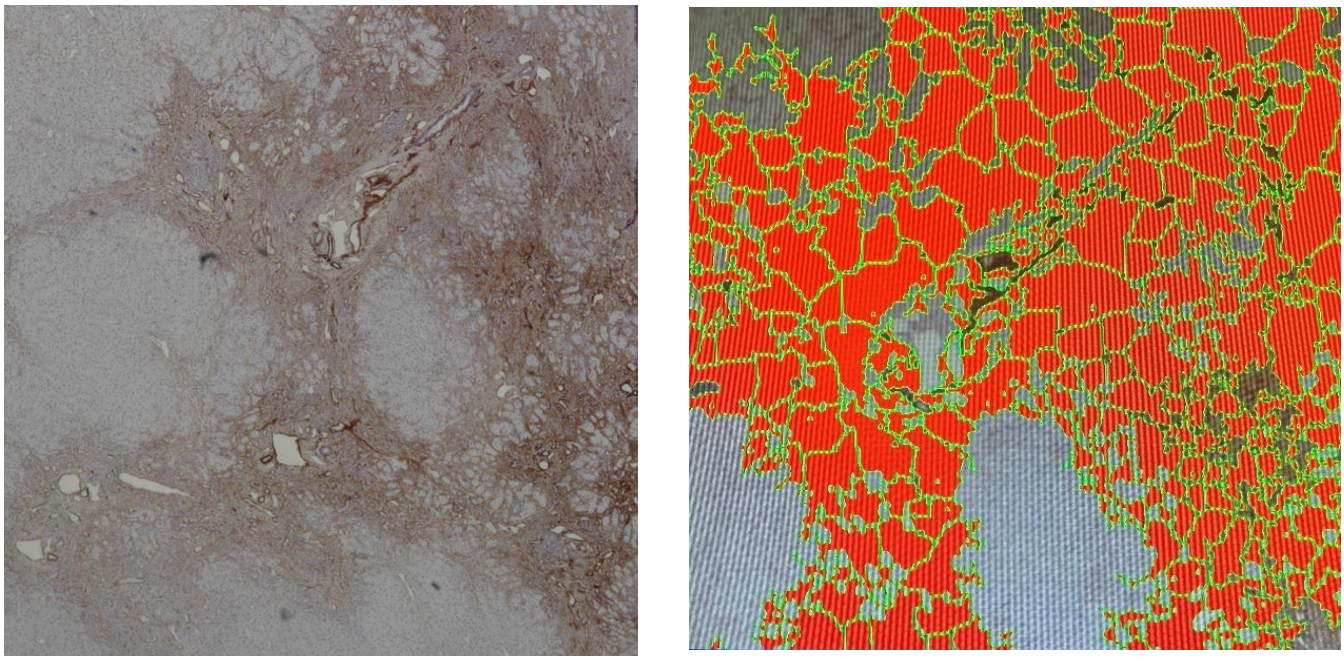
А **Б**

Рисунок 29А-Б – Фибротические изменения печени пациентки С.: Портальные тракты расширены, склерозированы с полными порто-портальными и порто-центральными септами, отмечается формирование ложных долек. Окраска по Масону, увеличение 4х (А), увеличение 10х (Б).

У ребенка были оценены сывороточное содержание К-I, К-III, К-IV и ГК: концентрация К-I составила 68,59 нг/мл, К-III – 0,04 нг/мл, К-IV – **97,2** нг/мл, ГК – **98,6** нг/мл.

Значения концентраций прямых маркеров фиброзирования свидетельствовали о наличии ЦП у ребенка. 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).

Проведено иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV: отмечается избыточное его отложение по ходу портальных трактов, порто-портальных и портоцентральных септ, вдоль сформированных ложных долек. Было оценено тканевое содержание К-IV, которое показало следующие результаты: площадь окрашивания препарата при иммуногистохимическом исследовании составила 1756276,652 нм^2, что является **49,87** % от общей площади препарата, равной 3521709,75 нм^2 (Рисунок 30А-Б).



А **Б**

Рисунок 30А-Б – Особенности отложения К-IV у пациентки С. с ЦП в исходе АИГ. А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV, увеличение 4х; Б – подсчет площади отложения К-IV по отношению к общей площади ткани печени.

Таким образом, с учетом синдрома цитолиза АЛТ 1595 МЕ/л, АСТ 1503 МЕ/л в дебюте заболевания, гипергаммаглобулинемии IgG 47 г/л, повышения СОЭ до 26 мм/час, гиперпротеинемии 93 г/л, высокого титра печеночноспецифических аутоантител (АНФ 1:2560, ASMA 1:2560), результатов морфологического исследования, у ребенка верифицировано течение аутоиммунного гепатита 1 типа с исходом в ЦП. В соответствии с международными клиническими рекомендациями EASL по лечению АИГ ребенку назначена глюкокортикостероидная терапия Преднизолоном из расчета 1 мг/кг/сутки с постепенным снижением дозы до поддерживающей, цитостатическая терапия Азатиоприном из расчета 2 мг/кг/сутки, гепатопротекторная терапия Урсодезоксихолевой кислотой из расчета 20 мг/кг/сутки.

Данный клинический пример иллюстрирует течение аутоиммунного гепатита высокой степени активности с развитием цирроза печени у ребенка,

при этом валидированные в нашем исследовании значения сывороточных концентраций К-IV и ГК отражают тканевое их содержание и морфологическую стадию фиброза и могут быть использованы в качестве диагностики стадии фиброза в динамике, без повторного проведения биопсии печени.

6.2. Клинический случай №2

Диагностика начальной стадии фиброза печени при хронической форме ее патологии

Мальчик Г., 11 лет.

Анамнез жизни: ребенок от 2 беременности, 2 родов (1 беременность - девочка 08.10.2001, здорова). Беременность протекала на фоне цитомегаливрусной инфекции у матери. Роды в срок. на 40 неделе, тугое обвитие пуповины вокруг шеи. Оценка по шкале APGAR 8-9 баллов. Масса при рождении 4000 гр, длина тела 53 см. Грудное вскармливание до 1 мес, далее – искусственное. Нервно-психическое развитие без особенностей. Наследственный и аллергологический анамнез не отягощены.

Дебют заболевания с возраста 6 лет, когда появились иктеричность кожных покровов, боли в животе, потемнение мочи, указанные жалобы явились причиной обращения к гастроэнтерологу по месту жительства последующей госпитализации. При обследовании: по лабораторным данным выявлена анемия легкой степени (Hb 111 г/л), повышение СОЭ до 27 мм/час, гипербилирубинемия (общий билирубин 114 мкмоль/л, прямой билирубин 87,8 мкмоль/л), синдромы цитолиза (АЛТ 1100 МЕ/л, АСТ 1544 МЕ/л) и холестаза (ЩФ 468 МЕ/л, ГГТ 174,3 МЕ/л).

По данным дополнительного обследования: антитела к гладкой мускулатуре (ASMA) <1:40 (норма <1:40), антитела к микросомам печени и почек (anti-LKM1) 1:80 (норма <1:40), антимитохондриальные антитела (АМА) <1:40 (норма <1:40).

Исключены болезнь Вильсона (церулоплазмин 35,7 мг/дл – сывороточная концентрация соответствует норме) и альфа-1-антитрипсиновая недостаточность (альфа-1-антитрипсин 240 мг/дл – сывороточная концентрация соответствует норме).

По данным УЗИ органов брюшной полости – гепатоспленомегалия. ТЭ печени: медиана составила 8,6 кПа (F2 по METAVIR). ЭГДС: гастродуоденит; данных за варикозное расширение вен пищевода нет.

Проведена биопсия печени: в биоптате 4 печеночные дольки с выраженным воспалением – во всех дольках массивные ступенчатые и лобулярные некрозы, активация купферовских клеток, лимфоцитов в синусоидах. В зонах перипортальной воспалительной инфильтрации гепатоциты формируют розеткообразные структуры. В перипортальных зонах и портальных трактах массивная лимфогистиоцитарная инфильтрация с примесью нейтрофильных лейкоцитов, плазматические клетки. Выраженный фиброз и расширение портальных трактов, выражен перивенулярный фиброз. Врастания фиброзных септ в дольку нет, ложных долек нет. Фиброзные муфты вокруг новообразованных желчных протоков. Заключение: морфологические признаки хронического гепатита с выраженной активностью и массивным билиарным фиброзом. Ребенку верифицирован диагноз: аутоиммунный гепатит, первичный склерозирующий холангит. Ребенку верифицирован диагноз: Аутоиммунный гепатит 2 типа, назначена глюкокортикостероидная терапия Преднизолоном из расчета 1 мг/кг/сутки с постепенным снижением дозы до поддерживающей, цитостатическая терапия Азатиоприном из расчета 1,5 мг/кг/сутки, гепатопротекторная терапия урсодезоксихолевой кислотой из расчета 15 мг/кг/сутки.

Назначенную терапию пациент получал в полном объеме. После 4 лет терапии у ребенка отмечалась стойкая биохимическая ремиссия на фоне проводимой глюкокортикостероидной и цитостатической терапии. С целью решения вопроса о тактике дальнейшего лечения ребенок был направлен в

гастроэнтерологическое отделение с гепатологической группой ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

При поступлении предъявляет жалобы на повышенную утомляемость. Общее состояние средней тяжести. Физическое развитие среднее, гармоничное: масса тела 35 кг, рост 145 см. Кожные покровы и слизистые оболочки бледно-розовые. Носовое дыхание свободное. Живот визуально не увеличен. Край печени пальпируется у края правой реберной дуги, селезенка не пальпируется. Стул самостоятельный, оформленный, без примесей, окрашен. Моча светлая, периферических отеков нет.

По результатам лабораторного обследования: синдромов цитолиза и холестаза не зарегистрировано, белково-синтетическая функция печени сохранена (Таблица 20).

Таблица 20 – Результаты лабораторного обследования пациента Г.

Показатель	**Значение**	**Норма**
Гемоглобин (г/л)	122	120-145
Эритроциты (10^12/л)	4,3	4-5,2
Лейкоциты (10^9/л)	7,63	4,5 - 11,5
Тромбоциты (10^9/л)	254	150 - 440
СОЭ (мм/час)	2	2-20
АЛТ (МЕ/л)	8,3	<40
АСТ (МЕ/л)	17,5	<42
ГГТ (МЕ/л)	9,5	5-35
ЩФ (МЕ/л)	159	60-400
Билирубин общий (мкмоль/л)	18,6	3,7-20,5
Билирубин прямой (мкмоль/л)	1,5	<5,1

Глюкоза (ммоль/л)	3,82	3,3-5,5
Общий белок (г/л)	72,09	60-80
Альбумин (г/л)	44,2	38-54
IgG (г/л)	7,89	6,98 - 15,6
IgM (г/л)	0,88	0,31 - 1,8
IgA (г/л)	1,99	0,53 - 2,04
Церулоплазмин (мг/дл)	23,6	17-54
Альфа-1-антитрипсин (мг/дл)	143	90 - 200
Лактат (ммоль/л)	2,1	0,5 - 2,2
Аммиак (мкмоль/л)	35	11 - 35
АФП (МЕд/мл)	0,9	0 - 3,1
ПТИ (%)	97	70-120
ПТВ (сек)	14	14-16
МНО (<>)	1,02	0,97 - 1,3
АЧТВ (сек)	33,1	28 - 37,9
Фибриноген (г/л)	2,48	2,12 - 4,33

Ребенку проведена оценка титра печеночноспецифических аутоантител: ASMA <1:40 (норма <1:40), anti-LKM1 1:160 (норма <1:40), AMA <1:40 (норма <1:40).

По данным ультразвукового исследования органов брюшной полости: размеры печени не увеличены, паренхима диффузно неоднородная, повышенной эхогенности, сосудистый рисунок усилен, умеренно деформирован, стенки сосудов уплотнены, вплоть до мелких ветвей с деформацией висцерального контура, воротная вена диаметром 9 мм, кровоток при цветовом допплеровском картировании (ЦДК) 15-17 см/сек, волнообразный. Выполнена транзиентная эластография печени: при проведении серии измерений в правой доле печени медиана плотности составила 7,7 кПа (повышена). Колебания показателей

эластичности в отдельных измерениях от 5,8 до 10,8 кПа; IQR 1,6; S.rate 100 %. Заключение: результаты могут соответствовать умеренному фиброзу (F2 по шкале METAVIR). МРТ органов брюшной полости с МРХПГ (Рисунок 31) позволила получить следующие данные: печень в размерах не увеличена, вертикальный размер правой доли 148 мм, левой 50 мм, контуры ровные, четкие, нижний край правой доли заострен, паренхима диффузно неоднородна, без очаговых изменений. Портальная вена калибром до 8 мм. Внутрипеченочные протоки не расширены. Внепеченочные протоки не расширены, контуры их ровные, четкие. Долевые протоки: калибром до 2 мм. Общий печеночный проток калибром до 2,5 мм, ход не изменен. Холедох диаметром калибром до 2,5 мм, ход не изменен. Селезенка не увеличена, контуры четкие, ровные, паренхима однородна, селезеночная вена до 4 мм.

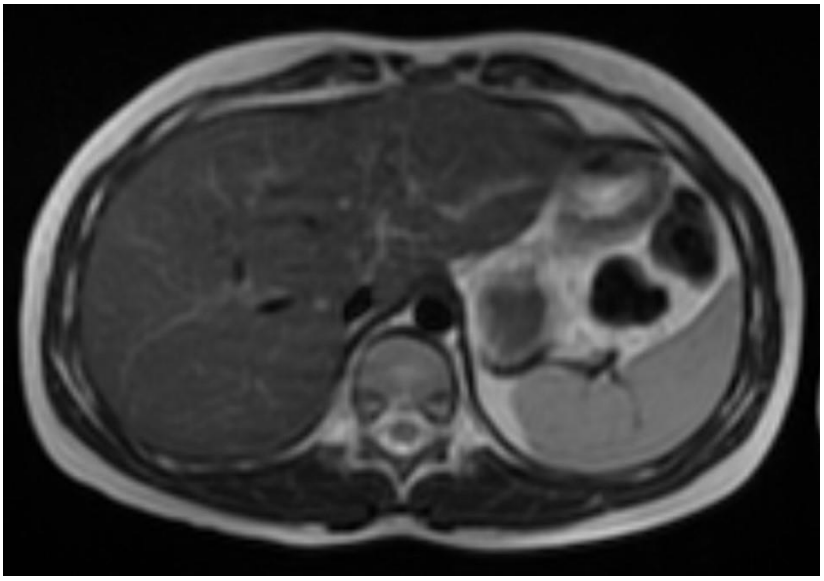
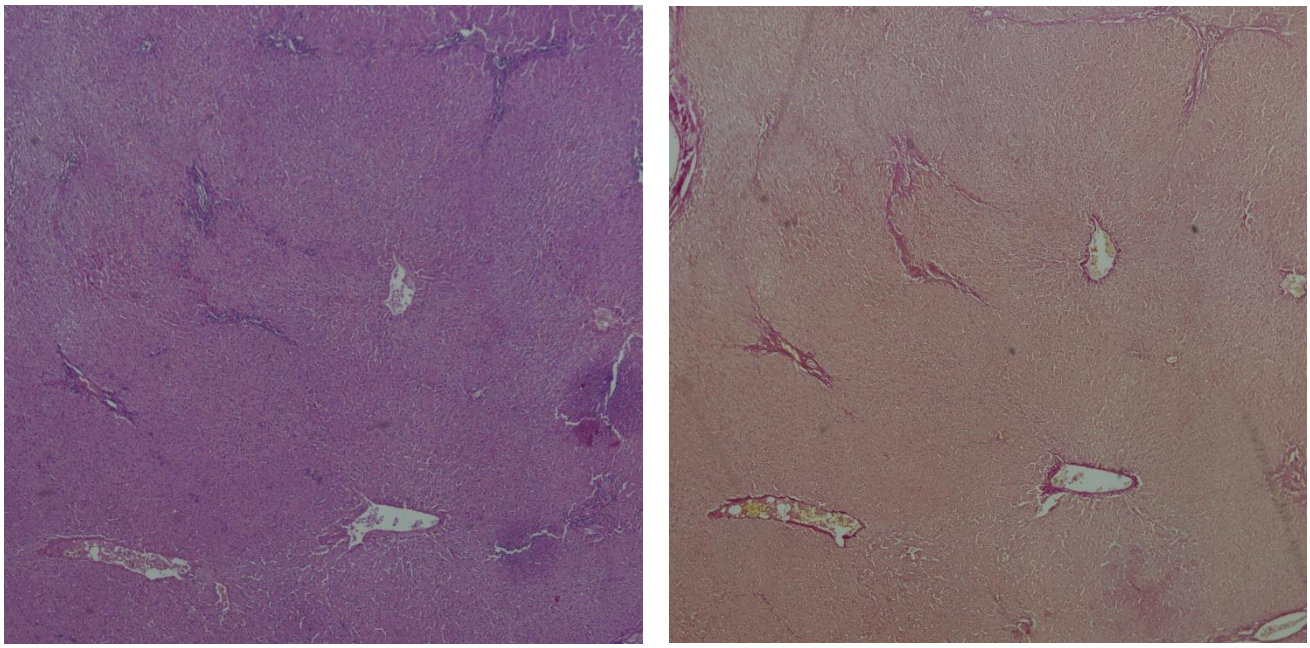


Рисунок 31 – МРТ органов брюшной полости ребенка Г.: паренхима печени диффузно неоднородна, без очаговых изменений.

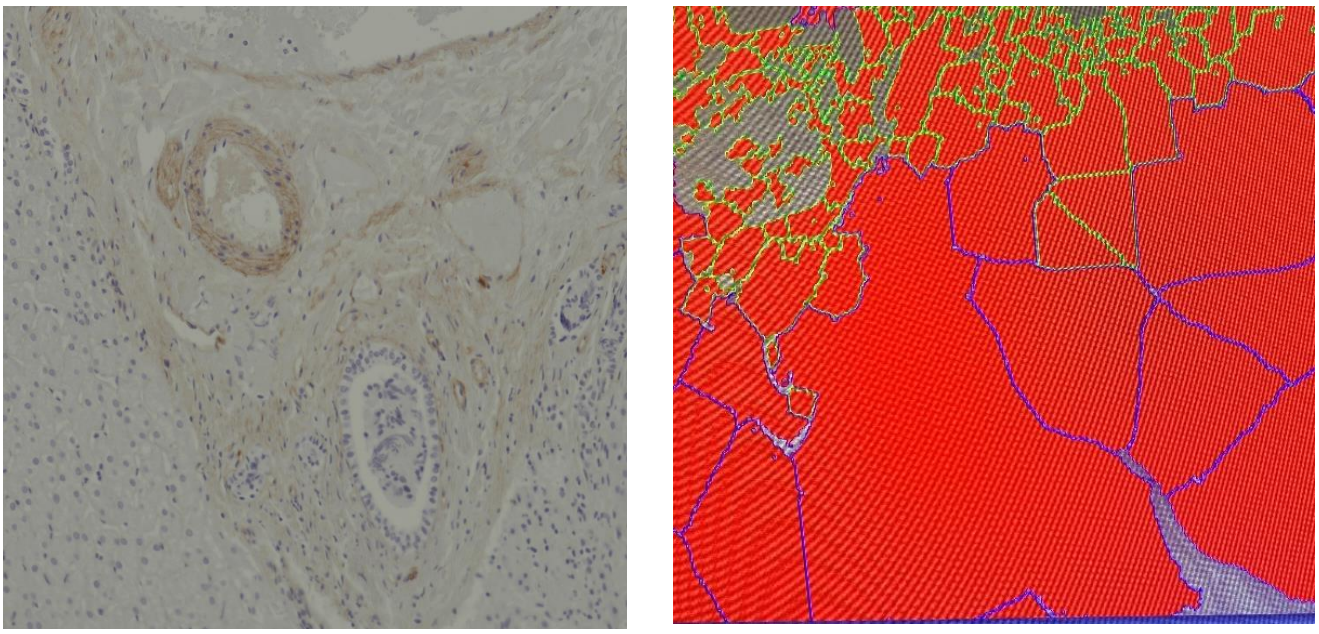
Ребенку выполнена лапароскопическая биопсия печени. По данным морфологического исследования выявлено (Рисунок 32А-Б): капсула неравномерно фиброзирована, очагово с небольшими лимфо-гистиоцитарными инфильтратами. Портальные тракты умеренно фиброзированы, близко расположены друг к другу, отдельные соединены тонкими порто-портальными

септами. Умеренный фиброз стенок центральных вен. Под капсулой определяется 2 небольших дольки без центральных вен. В портальных трактах и септах, а также проникая в паренхиму печени определяются пролиферирующие желчные протоки (СК7, СК19). В портальных трактах определяются лимфоидные инфильтраты, пограничная пластинка сохранена. Гепатоциты обычных размеров, формы, балочное строение различимо. Цитоплазма гепатоцитов мелкозернистая, в единичных гепатоцитах – прозрачные вакуоли (стеатоз). Слабо выраженный анизокариоз. Вакуолизация ядер гепатоцитов, преимущественно в перипортальной зоне. При проведении PAS-реакции - неравномерное накопление PAS-позитивного вещества, которое полностью вымывается в контроле с амилазой. Окраска на железо по Перлсу – отрицательный результат. Заключение. Краевая биопсия печени. В препаратах присутствуют признаки хронического перипортального гепатита минимальной степени гистологической активности без учета склероза. Индекс гистологической степени активности по Knodell - 2 балла (I – A, II – B, III – B). Индекс склероза по Десмет – 2 балла (умеренный). По шкале Метавир: A (гистологическая активность) – A0 (pmn-0; ln-0), F – 2.



А **Б**

Рисунок 32А-Б – Морфологические изменения печени пациента Г.: портальные тракты фиброзированы, отдельные соединены тонкими порто-портальными септами. В портальных трактах определяются лимфоидные инфильтраты, пограничная пластинка сохранена. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 4х (А), окраска по методу Ван-Гизона, увеличение 4х (Б).



А **Б**

Рисунок 33А-Б – Особенности отложения К-IV у пациента Г. с умеренным фиброзом печени (F2) в исходе аутоиммунного гепатита. А – иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV, увеличение 10х; Б – подсчет площади отложения К-IV по отношению к общей площади ткани печени.

Проведено иммуногистохимическое окрашивание биоптата печени на К-IV: отмечается его отложение в портальных трактах. Было оценено тканевое содержание К-IV, которое показало: площадь окрашивания препарата при иммуногистохимическом исследовании составила 732867,799 нм^2, что является **20,81** % от общей площади препарата, равной 3521709,75 нм^2 (Рисунок 33А-Б).

У ребенка были оценены сывороточные концентрации коллагенов I, III, IV типов и ГК: концентрация К-I составила **153,36** нг/мл, К-III – 2,47 нг/мл, К-IV – **12,7** нг/мл, НА – **33,8** нг/мл.

Таким образом, ребенку был верифицирован диагноз: Аутоиммунный гепатит 1 типа. Фиброз печени, умеренный, F2 по шкале METAVIR. С учетом сохранения гистологической активности и положительного титра печеночно-

специфических аутоантител, несмотря на пятилетнюю стойкую медикаментозную биохимическую ремиссию, ребенку показано продолжить глюкокортикостероидную терапию Преднизолоном в поддерживающей дозировке, а также цитостатическую терапию Азатиоприном из расчета 1 мг/кг/сутки.

Представленный клинический пример отражает формирование фиброза на начальной стадии у ребенка с ХБП. Характерным для данной стадии является преобладание К-I среди волокон ЭЦМ, что отражается в выраженном повышении его сывороточной концентрации наряду с низкими концентрациями K-IV и НА, что может быть использовано для неинвазивной диагностики фиброза у ребенка с хронической формой патологии печени.

6.3. Клинический случай №3

Сывороточное содержание прямых маркеров фиброгенеза при субкомпенсированном циррозе печени

Мальчик Д., 11 лет.

Из анамнеза: Ребенок от 3 беременности, 3 родов. Беременность протекала на фоне анемии. Масса тела при рождении 3750 гр, рост 55 см, оценка по шкале APGAR 7/8 баллов. Наследственный анамнез не отягощен.

В возрасте 10 месяцев при плановом контроле клинического анализа крови диагностирована анемия – гемоглобин 103 г/л. Ребенку выставлен диагноз: Железодефицитная анемия. Назначена терапия препаратами железа, при контроле лабораторных показателей гемоглобин без положительной динамики: от 105 до 79 г/л.

По достижении 4,5 лет впервые проведен биохимический анализ крови, по данным которого диагностирован синдром цитолиза: АЛТ 232 МЕ/л, АСТ 238 МЕ/л, при этом в клиническом анализе крови зафиксировано повышение СОЭ до 35 мм/ч, а по данным проведенного УЗИ брюшной полости выявлена

гепатоспленомегалия. По совокупности результатов проведенного по месту жительства обследования ребенок был направлен в гастроэнтерологическое отделение с гепатологической группой ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

При поступлении (возраст 5 лет) состояние расценено как средней степени тяжести. Отмечались жалобы на рецидивирующие носовые кровотечения. При физикальном обследовании физическое развитие среднее, гармоничное. Пальпируется селезенка +3 см от края левой реберной дуги. По лабораторным данным: анемия тяжелой степени (Hb 67 г/л), лейкопения (3,2 10^9/л), повышение СОЭ до 22 мм/час. По данным биохимического анализа крови – синдром цитолиза: АЛТ 281 МЕ/л, АСТ 210 МЕ/л. Лабораторно диагностирована иммунологическая активность в виде повышения сывороточной концентрации IgG до 27 г/л. Исключены наследственные болезни обмена: бета-галактозидаза 161,9 нМ/мг/час (норма 98,3-323,9), бета-глюкозидаза 5,2 нМ/мг/час (норма 4,7-18,7), хитотриазидаза 20,2 нМ/мл/час (норма 5,5-198), уровень сфингомиелиназы – в норме; полный сиквенс гена, ответственного за развитие болезни Нимана-Пика тип С: мутаций не выявлено. Таким образом, ребенку были исключены болезни Гоше, Краббе, Помпе, Фабри, Ниманна-Пика типы А, В, С, мукополисахаридоз.

С учетом гипергаммаглобулинемии ребенку проведена оценка титра печеночноспецифических аутоантител: антигладкомышечные антитела 1:1280 при норме менее 1:40, что позволило верифицировать диагноз: Цирроз печени, компенсированный, класс А по Чайлд-Пью, в исходе аутоиммунного гепатита 1 типа. Ребенку была назначена глюкокортикостероидная терапия Преднизолоном из расчета 1 мг/кг/сутки с постепенным снижением дозы до поддерживащей (5 мг в сутки), цитостатическая терапия Азатиоприном из расчета 1 мг/кг/сутки.

Далее ребенок наблюдался по месту жительства, назначенную терапию получал нерегулярно. В возрасте 6 лет в связи с частыми носовыми кровотечениями, тромбоцитопенией по месту жительства (г. Челябинск) проведена спленэктомия.

В возрасте 11 лет значительно участились носовые кровотечения, присоединились боли в животе, в связи с чем родители повторно обратились в гастроэнтерологическое отделение с гепатологической группой ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

При поступлении состояние расценено как тяжелое. Физическое развитие среднее, гармоничное (масса тела 45 кг, рост 147 см). Кожные покровы бледно-розовые, гиперемия кожи ладоней (печеночные ладони), усиленный венозный рисунок кожи передней поверхности брюшной стенки. Носовое дыхание свободное. Над легкими аускультативно выслушивается везикулярное дыхание, проводится во все отделы равномерно, хрипов нет. Одышки нет. ЧДД 19 движений в мин. Сатурация (SpO2) 98%. Область сердца визуально не изменена. Перкуторно границы сердца не расширены. Тоны сердца ясные, звучные, шумов нет. ЧСС 68 в мин. Артериальное давление 98/65 мм рт. ст. Живот доступен поверхностной и глубокой пальпации. Печень пальпируется +1.5 см ниже правой реберной дуги, край плотно-эластичной консистенции, безболезненный. Селезенка не пальпируется (спленэктомия). Стул регулярный, 1 раз в сутки, окрашен, без примесей. Мочеиспускание свободное, безболезненное. Менингеальной и очаговой симптоматики нет.

Было проведено комплексное лабораторное, инструментальное и морфологическое обследование пациента.

Таблица 21 – Показатели лабораторного обследования пациента Д.

Показатель	**Значение**	**Норма**
Гемоглобин (г/л)	**95**	120-145
Эритроциты (10^12/л)	**3,18**	4-5,2
Лейкоциты (10^9/л)	8,52	4,5 - 11,5
Тромбоциты (10^9/л)	307	150 - 440
СОЭ (мм/час)	**74**	2-20

АЛТ (МЕ/л)	**556**	<40
АСТ (МЕ/л)	**985**	<42
ГГТ (МЕ/л)	**188**	5-35
ЩФ (МЕ/л)	362	60-400
Билирубин общий (мкмоль/л)	**66**	3,7-20,5
Билирубин прямой (мкмоль/л)	**37**	<5,1
Глюкоза (ммоль/л)	4,37	3,3-5,5
Общий белок (г/л)	**90,34**	60-80
Альбумин (г/л)	**23,9**	38-54
IgG (г/л)	**52,0**	6,98 - 15,6
IgM (г/л)	1,44	0,31 - 1,8
IgA (г/л)	1,62	0,53 - 2,04
Лактат (ммоль/л)	1,31	0,5 - 2,2
Аммиак (мкмоль/л)	**61,6**	11 - 35
АФП (МЕд/мл)	**180,6**	0-3,1
ПТИ (%)	**50**	70-120
ПТВ (сек)	**20,9**	14-16
МНО (<>)	**1,56**	0,97 - 1,3
АЧТВ (сек)	**41,3**	28 - 37,9

Как видно из Таблицы 21, у пациента отмечались синдромы цитолиза и холестаза, выраженная гиперпротеинемия при гипоальбуминемии, потребовавшей инфузий препарата альбумина человека с заместительной целью ввиду наличия свободной жидкости в брюшной полости по данным УЗИ органов брюшной полости, а также синдром гипокоагуляции. Цитопении у ребенка не отмечалось ввиду проведенной по месту жительства спленэктомии.

Оценен титр печеночноспецифических аутоантител: антитела к гладкой мускулатуре ASMA 1:5120 (титр высокоположительный; норма <1:40). Исключены IgG4-ассоциированные заболевания: IgG4 в сыворотке крови – 1.09 г/л (норма 0.1-1.35 г/л).

По данным ультразвукового исследования: печень увеличена, контур неровный, крупно-волнистый, край закруглен; Паренхима выражено диффузно неоднородная, повышенной эхогенности, сосудистый рисунок деформирован, усилен, стенки сосудов уплотнены, вплоть до мелких ветвей с деформацией висцерального контура и с формированием тяжистости, фиброзно-жировая ткань в воротах печени и по ходу крупных ветвей; воротная вена 12,7 мм, на границе IV-V сегментов визуализируется округлое гиперэхогенное образование с четким, неровным контуром, размером43х39 мм, кровоток при ЦДК огибающий, аналогичное образование визуализируется на границе VII-VIII сегментов, размером 17х14 мм.

Проведена транзиентная эластография печени: медиана плотности 52,7 кПа – выраженно повышена, колебания показателей эластичности в отдельных измерениях от 29,9 до 75,0 кПа; IQR 15,6; процент успешных измерений (S.rate) 71 %. Результаты соответствуют циррозу печени (F4 по шкале METAVIR).

Проведена КТ органов брюшной полости: Состояние после спленэктомии от 03.03.2015 г. На серии томограмм печень увеличена, размером 200х215х100мм, контуры неровные, бугристые, структура неоднородная, во все фазы исследования, плотность паренхимы 40-50 HU. Отмечается наличие гиперденсивных очагов и накопление ими контрасного вещества (Рисунок 34): в VI сегменте, размером 12х10 мм, плотностью 50-55 HU до контрастного усиления и 90-95 HU после и размером 48х37 мм, плотностью 55-60 HU до контрастного усиления и 90 HU после контрастного усиления; в IV сегменте, размером 10х15 мм, плотностью 60 HU до контрастного усиления и 95-100 HU после контрастного усиления. Внутри и внепечёночные желчные протоки не расширены. Желчный пузырь с изгибом и перетяжкой в области тела, содержимое желчного пузыря однородное, рентгеноконтрастных конкрементов не выявлено,

стенки пузыря не утолщены. Воротная вена диаметром 13 мм, прослеживаются обе ветви воротной вены. Селезенка не визуализируется. На уровне сканирования в брюшной полости по наружной границе печени отмечается наличие свободной жидкости, толщиной до 22 мм.



Рисунок 34 – КТ органов брюшной полости ребенка Д.: печень увеличена, контуры неровные, бугристые, структура неоднородная. Состояние после спленэктомии.

По данным эзофагогастрдуоденоскопии – варикозное расширение вен пищевода 1 степени без угрозы кровотечения.

По данным проведенной МРТ органов брюшной полости с магнитнорезонансной холангиопанкреатографией: свободная жидкость по контуру печени, межпетельно; печень расположена обычно, диспропорциональна, вертикальный размер правой доли – до 194 мм, левой доли – 52 мм; контуры печени неровные, бугристые, нижний край правой доли закруглен, паренхима грубо диффузно неоднородная, «пестрая», с выраженными фиброзными изменениями и наличием множественных разнокалиберных узлов регенерации (Рисунок 35). Воротная вена 14 мм. Внутри- и внепеченочные протоки не расширены. Долевые протоки калибром до 2,5 мм, контуры четкие, ровные. Холедох прослеживается, диаметр просвета до 3,7 мм, контуры ровные. Визуализируемые желчные протоки не деформированы. Заключение: магнитно-

резонансная картина асцита, гепатомегалии, грубых диффузно-фиброзно-цирротических изменений паренхимы печени с формированием множественных разнокалиберных узлов регенерации, отечности ложа желчного пузыря.

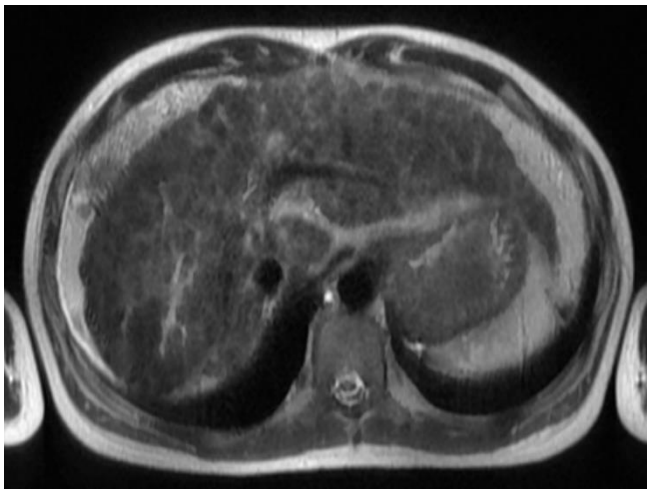
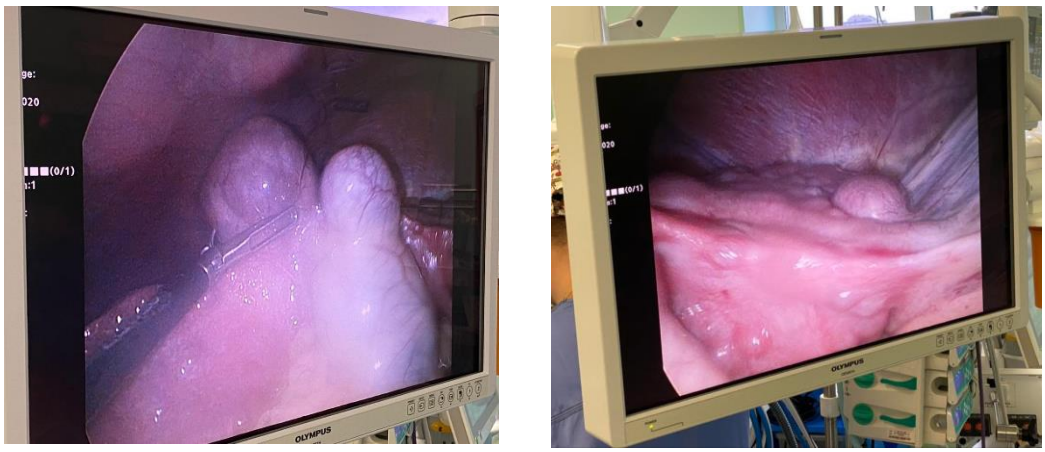


Рисунок 35 – МРТ органов брюшной полости ребенка Д.: контуры печени неровные, бугристые, нижний край правой доли закруглен, паренхима грубо диффузно неоднородная, «пестрая», с выраженными фиброзными изменениями и наличием множественных разнокалиберных узлов регенерации. Состояние после спленэктомии.

Ребенку проведена лапароскопическая биопсия печени: визуализированы множественные очаги макронодулярной гиперплазии ткани печени. Проведена резекция гиперпластического узла ткани печени (Рисунок 36А-Б).



А **Б**

Рисунок 36А-Б – Внешний вид печени пациента Д. при лапароскопии.

Макроскопически: доставлен узел диаметром 2 см. Поверхность - гладкая. На разрезе - ткань серо-красная, узловатого вида. Микроскопическое описание: объемное образование представлено печенью, в краях резекции признаки коагуляции. Фиброзная капсула умеренной толщины, под ней отмечаются поля пролиферирующих желчных протоков с выраженной лимфомоноцитарной инфильтрацией и замурованными единичными гепатоцитами. Портальные тракты широкие, склерозированные с полными порто-портальными септами с формированием ложных долек. Виден перегепатоцеллюрярный фиброз вокруг портальных трактов и центральных вен. В портальных трактах и септах выраженная пролиферация желчных протоков с одинаковой экспрессией СК7 и СК19. Отмечается неравномерная выраженная воспалительная инфильтрация, состоящая из макрофагов, лимфоцитов, плазмоцитов, сегментоядерных лейкоцитов, терминальная пластинка повреждена. Видны перипортальные гепатоциты, окруженные воспалительной инфильтрацией. Гепатоциты разного размера, отмечаются дву- и многоядерные, цитоплазма зернистая встречаются единичные вакуоли. Видны многочисленные крупные гепатоциты с прозрачной цитоплазмой (баллонная дистрофия), встречаются многочисленные эозинофильные тельца. Отмечаются аденоматоидные структуры. Имеются очаговые некрозы гепатоцитов с лимфомакрофагальной реакцией. Центральные вены умеренной ширины, вокруг них отмечаются очаговые некрозы гепатоцитов с лимфомакрофагальной реакцией. AFP реакция клеток печени отрицательная, индекс пролиферативной активности низкий (Ki67 <5%). CEA реакция отрицательная. CD34 позитивная реакция в портальных трактах и отдельных капиллярах, реакция в синусоидах отрицательная. CD10 отмечается очаговая реакция на мембране гепатоцитов в аденоматоидных структурах. Прослеживается сеть ретикулярных волокон. Заключение: регенераторный узел при циррозе. Пролиферация желчных протоков. Перипортальный гепатит высокой степени гистологической активности Knodell 11 (I-D, II-D, III-C). Индекс склероза по Десмет 4 (цирроз), по METAVIR A3 (pmn-2; ln-2), F4.

Ребенку проведена оценка сывороточной концентрации прямых маркеров фиброгенеза: концентрация К-I составила 172,9 нг/мл, K-III – 0,41 нг/мл, K-IV – **300,36** нг/мл, НА – **698,0** нг/мл.

На основании результатов проведенного обследования ребенку выставлен диагноз: Цирроз печени, субкомпенсированный, класс В по Чайлд-Пью, осложненный асцитом, гипокоагуляцией, варикозным расширением вен пищевода 1 степени, в исходе аутоиммунного гепатита I типа. Ребенок была направлен в НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова Минздрава России для проведения родственной трансплантации печени.

Таким образом, данный клинический пример иллюстрирует выраженное повышение сывороточных концентраций прямых биомаркеров фиброгезена у пациента с субкомпенсированным циррозом печени, что иллюстрирует выраженные цирротические изменения ткани печени у данного ребенка и свидетельствует о том, что сывороточные концентрации К-IV типа и ГК отражают тканевые из концентрации.

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФП – результат стимуляции фиброгенеза, то есть отложения ЭЦМ и нарушения процесса фибролиза (деградации ЭЦМ). Начальное звено формирования фиброза - некроз гепатоцитов, который вызывает активацию ЗКП. Через активацию ЗКП проходят три стадии фиброгенеза: пре-воспалительная фаза активации ЗКП при некрозе гепатоцитов, воспалительная фаза, при которой ЗКП дифференцируются в миофибробласты, и пост-воспалительная фаза, когда миофибробласты секретируют цитокины и компоненты ЭЦМ. Цитокины способны стимулировать миофибробласты и ЗКП, создавая цепочку «положительной обратной связи», или порочный круг, делая процесс фиброгенеза необратимым. Главный цитокин, определяющий этот эффект – трансформирующий фактор роста β (TGF-β). TGF-β стимулирует продукцию ЭЦМ и уменьшает деградацию ЭЦМ. Изменения в секреции и деградации компонентов ЭЦМ используются в качестве биомаркеров для некоторых неинвазивных методов скрининга фиброза печени. Изменение структуры ЭЦМ, в свою очередь, увеличивает его плотность, что используется физическими методами неинвазивной диагностики фиброза печени.

До середины XX века ХБП часто диагностировались уже на стадии цирроза. Первыми количественными неинвазивными маркерами заболеваний печени стали сывороточные концентрации печеночных ферментов. Оценка щелочной фосфатазы и трансаминаз стала доступна с 1930 и 1955-1956 гг. соответственно, и в настоящее время их способность отражать тяжесть фибротических изменений печени продолжает изучаться [79]. В 1958 г. Menghini предложил технику «биопсии печени за одну секунду» и биопсийную иглу. Благодаря такому прижизненному исследованию ткани спектр известных хронических заболеваний печени стал расширяться. Появились различные методы визуализации. Внедрение все более эффективных терапевтических средств в 1980-х годах превратило гепатологию из преимущественно описательной дисциплины в терапевтическую, способную помочь многим пациентам [84].

За последние десятилетия учеными во всем мире показано, что принятый «золотой стандарт диагностики» - морфологическая оценка биоптата – имеет ряд ограничений [29]. Поиск неинвазивных техник диагностики фиброза привел к разработке множества шкал с применением лабораторных маркеров [72]. Неинвазивные методы диагностики более безопасны для пациента по сравнению с биопсией печени, кроме того, они могут быть проведены повторно в динамике, чтобы оценить состояние печени в течение длительного времени. Большинство доступных в настоящее время неинвазивных методик диагностики значительно экономически выгоднее принятого «золотого стандарта». Их практическое использование растет с каждым годом, и в ряде стран частота выполнения биопсии печени при вирусных гепатитах В и С неуклонно снижается благодаря развитию систем сывороточной и визуализационной диагностики. Последние исследования свидетельствуют о том, что оценка степени фиброза неинвазивными методами является такой же точной, как и морфологическое исследование.

В связи с этим, целью нашего исследования была оценка диагностических возможностей прямых сывороточных биомаркеров фиброзирования и транзиентной эластографии для идентификации различных стадий фиброза при хронических болезнях печени у детей.

Для решения поставленных задач нами было обследовано 295 детей, из них 278 детей с ХБП различной этиологии и 17 условно здоровых детей. В ретроспективную часть исследования (группа I) было включено 135 пациентов с ХБП, из них 39% мальчиков и 61% девочек. Медиана возраста на момент обследования составила 10,1 лет [9,6; 16 лет]. Минимальный возраст – 3 года, максимальный – 17 лет. II группа (проспективная часть исследования) составила 143 ребенка с ХБП в возрасте от 5 до 17 лет 11 мес. Среди детей 42% составили мальчики (n=60), 58% - девочки (n=83). Распределение пациентов по нозологическим формам: преобладали дети с АИГ – 56 (39%); аутоиммунный гепатит в сочетании с первичным склерозирующим холангитом (АИГ+ПСХ) имел место у 32 (22%) пациентов; ПСХ был диагностирован у 25 (18%) детей;

аутоиммунный гепатит в сочетании с аутоиммунной холангиопатией (АИГ+АИХ) – у 14 (10%); первичным билиарным холангитом (ПБХ) и аутоиммунным холангитом (АИХ) страдали – по 6 детей (4%) соответственно; аутоиммунный гепатит в сочетании с первичным билиарным холангитом (АИГ+ПБХ) был верифицирован у 4 детей (3%).

Всем детям, включенным в ретроспективную часть исследования, было проведено измерение плотности печени методом ТЭ на аппарате FibroScan® 502 (Echosence, Франция). В качестве референса использовали микроморфологическую оценку биоптата печени, при этом биопсию проводили в промежутке не более 6 месяцев от даты выполнения ТЭ. Всем пациентам, включенным в проспективную часть исследования, выполняли краевую резекцию ткани печени.

В нашем исследовании мы проводили сопоставление клинико-лабораторных, инструментальных и морфологических показателей у детей в зависимости от стадии фиброза. Определено, что морфологическая стадия фиброза ассоциируется с изменениями клинико-лабораторных и инструментальных показателей, отражающих степень выраженности синдромов гиперспленизма (увеличение пальпаторных размеров селезенки (ρ=0,51, p<0,001), снижение количества тромбоцитов (ρ=-0,57, p<0,001) и портальной гипертензии (увеличение ультразвуковых размеров селезенки (ρ=0,56, p<0,001), диаметра воротной вены (ρ=0,37, p<0,001), а также признаки нарушения функционального состояния печени (снижение сывороточных концентраций альбумина (ρ=0,29, p<0,001), ПТИ (ρ=0,53, p<0,001), повышение МНО (ρ=0,54, p<0,001).

Следующим этапом исследования была валидация показателей транзиентной эластографии для оценки стадии фиброза. Как известно, в качестве скринингового метода при хронической патологии печени применяют ультразвуковое исследование, с помощью которого возможно диагностировать увеличение размеров органа, диффузные или очаговые изменения ее паренхимы. При проведении допплеровского картирования могут быть обнаружены признаки портальной гипертензии [5, 7]. Компьютерная томография и магнитно-

резонансная томография органов брюшной полости представляют диагностическую ценность при сформированном циррозе печени. Золотым стандартом диагностики фиброза продолжает оставаться биопсия печени с последующей морфологической оценкой стадии фиброза по общепринятым шкалам Ishak и METAVIR [1]. В связи с рисками биопсии печени, применение ТЭ у детей является оправданным и перспективным методом оценки стадии фиброза. Следует учитывать, что при ТЭ исследуемый объем ткани печени в 100–200 раз больше, чем при биопсии [8].

Проведенные у детей исследования показывают, что данные пограничных значений плотности печени при ТЭ для дифференциации стадий фиброза при ХБП разнятся. Причиной некоторых разночтений в публикациях относительно пограничных значений, вероятно, является отсутствие валидации S-режима ТЭ в детской популяции.

В исследование Fitzpatrick E. с соавт. (2013) были включены дети, которым проводилась биопсия печени по поводу ХБП. Всем пациентам проводилась ТЭ. Стадия ФП верифицировалась одним патологом по шкале METAVIR от отсутствия ФП (F0) до ЦП (F4), результаты измеренной методом ТЭ плотности печени сравнивали с результатами морфологического исследования. Всего было включено 104 ребенка (из них 62 мальчика, 42 девочки), средний возраст составил 13,6 лет. Распределение по нозологиям выгледло следубщим образом: аутоиммунные заболевания печени – 27 детей; неалкогольная жировая болезнь печени – 37 пациентов; пациенты после трансплантации печени – 16 случаев; ХГВ и ХГС – 8 детей; Болезнь Вильсона – 5 пациентов; криптогенный гепатит – 11 случаев. Результаты ТЭ оказалисиь статистически значимыми для диагностики умеренного ФП (F2) (p<0,001), выраженного ФП (F3) (p<0,001) и ЦП (F4) (p=0,003), со значениями AUROC 0,78, 0,79 и 0,96, соответственно. Согласно софрмулированным выводам авторов, ТЭ может служить дополнением к биопсии печени в диагностических целях [43].

Согласно данным мета-анализа, проведенного Hwang J. Y. и соавт. (2018), ТЭ показала суммарную чувствительность 95% (95% ДИ, 74–99%) и

специфичность 90% (95% ДИ, 81–95%) для диагнстики умеренного ФП (F2 по METAVIR) у детей. Мета-анализ включал 11 оригинальных статей с участием 723 пациентов.

Исследование Lee CK с соавт. (2018) включало 170 пациентов от 0 до 29 лет (медиана возраста составила 13 лет с хроническими болезнями печени различной этиологии: 21% - аутоиммунные поражения печени, 19% - вирусные гепатиты, 11% - неалкогольная жировая болезнь печени, 9% - холестатический гепатит, 9% - первичный склерозирующий холангит. Пороговые значения для разгарничения F3-F4 и F4 составили >8,6 кПа и >11,5 кПа с чувствительностью 81% и 84% соответственно [74].

Проведенное в 2015 году проспективное 2-фазное многоцентровое исследование, включавшее 188 взрослых пациентов ХГВ и ХГС, показало, что значение плотности печени при ТЭ для прогнозирования фиброза F2 составила 8,4 кПа с AUROC 0,89, чувствительностью 82%, специфичностью 79%, а для прогнозирования цирроза (F4) - 12,8 кПа с AUROC 0,92, чувствительностью 84%, специфичностью 86% [15].

По результатам нашего исследования установлено, что определяемые методом ТЭ значения плотности печени ≥5,8 кПа и ≥7,8 кПа соответствуют минимальному (F1) и умеренному фиброзу (F2), с AUROC 0,943 и 0,928, 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 AUROC 0,975 и 0,942, чувствительностью 95,7% и 78,2%, специфичностью – 93,7% и 100%, соответственно.

Проведенное нами исследование имеет ограничение: в работу включены дети с различными ХБП, поэтому группа является гетерогенной. Также следует учитывать, что воспаление в ткани печени может завышать показатели плотности печени, получаемые при ТЭ, что актуально для дебюта аутоиммунных болезней печени.

С помощью полученных нами данных могут быть разработаны руководящие принципы использования значений ТЭ в клинической практике для идентификации стадии фиброза при ХБП у детей. В сочетании с клиническими данными ТЭ может быть применена для оценки риска развития цирроза у детей. С течением времени накопление данных о достоверности измерения плотности печени у детей ТЭ может помочь идентифицировать пациентов с повышенным риском прогрессирующего фиброза и тех, кому требуется наблюдение за осложнениями цирроза при заболеваниях печени различной этиологии.

Во второй части проведенного нами исследования были зафиксированы определенные колебания сывороточных концентраций некоторых прямых биомаркеров ФП у детей в зависимости от выраженности структурных изменений органа. К основным результатам исследования можно отнести следующие: оценка содержания К-I в сыворотке крови позволяет отдифференцировать слабый и значительный ФП от ЦП, К-IV – слабый ФП от более тяжелых его стадий и от ЦП, ГК – выраженный ФП от слабого, а также ЦП от слабого, умеренного и значительного ФП. Выявленные корреляции гистологической стадии ФП с изменениями серологических уровней К-I, К-IV и ГК доказывают участие этих молекулярных соединений в процессах фиброзирования печени у детей.

В целом, полученные нами результаты согласуются с данными других авторов. Так, фактически все исследователи, которые занимаются изучением биомаркеров фиброзирования, единогласно признают, что ГК – достаточно информативный показатель прогрессирования патологии печени при различных заболеваниях, но в то же время публикации, посвященные исследованиям компонентов ЭЦМ у детей, несмотря на более чем 20-летнюю историю их изучения, по-прежнему немногочисленны.

Так, Hasegawa T. с соавт. (2000) оценили концентрацию ГК в сыворотке у 44 пациентов, оперированных по поводу билиарной атрезии. Средние уровни биомаркера при ЦП и тяжелом ФП составили 444,8±366,1 нг/л и 166,0±70,3 нг/мл, соответственно, что было достоверно выше чем при более легких стадиях фиброза [53]. Однако следует обратить внимание на выраженную неоднородность

данных в этом исследовании, о чем свидетельствует большое значение стандартного отклонения, поэтому на наш взгляд нельзя считать полученные результаты высокоинформативными. В нашем исследовании, включавшем 80 детей, сывороточные концентрации ГК при ЦП и значительном ФП оказались иными: 60,90 нг/мл и 35,80 нг/мл, соответственно.

В качестве альтернативных данных можно привести результаты научной работы, Saltik-Temizel I.N. с соавт. (2004), которые, обследовав 22 ребенка с ЦП, показали, что лишь у 8 (36,4%) из них уровень ГК был повышенным и в среднем составлял 166,0 нг/мл [103].

Того же мнения придерживаются и Wu F.M. с соавт. (2017), на основании своих результатов посчитавшие, что с помощью определения концентрации ГК в сыворотке крови нельзя точно предсказать гистологическую стадию ФП у взрослых [130].

В свою очередь, Lebensztejn D.M. с соавт. (2011), включив в исследование 52 ребенка в возрасте 4-19 лет (средний возраст – 12 лет) с гистологически подтвержденной НАЖБП, установили, что уровень ГК >19,1 нг/мл позволяет дифференцировать пациентов с ФП и без такового с чувствительностью 84%, специфичностью 55%, положительной прогностической значимостью – 52%, отрицательной прогностической значимостью – 86%, AUC=0,672 [73].

Nassef Y.E. с соавт. (2013) определили концентрацию ГК у 30 детей в возрасте 9-14 лет с хроническим гепатитом С и выявили достоверно более высокие показатели биомаркера у пациентов с умеренным и тяжелым ФП по сравнению с легким фиброзом (p<0,05) [90].

Не так давно появились сведения и об альтернативной диагностической значимости ГК. Так, интерес представляют данные, полученные Nishikawa H. с соавт. (2016), которые обследовали 298 взрослых пациентов с хроническим гепатитом С, среди которых 61 больной имел белково-энергетическую недостаточность. Оказалось, что среднее значение уровня ГК в сыворотке крови у таких субъектов было достоверно выше (p<0,0001), чем у пациентов без белково-энергетической недостаточности: 389,0 нг/мл (диапазон колебаний: 43,6-6340,0

нг/мл) против 103,0 нг/мл (9,0-783,0 нг/мл). Пороговое значение ГК – 151,0 нг/мл было значимым прогностическим фактором, связанным с наличием белково-энергетической недостаточности (чувствительность 93,4%, специфичность 62,0%, p<0,0001, AUC=0,849) [91].

Большой пласт научных исследований посвящен изучению биомаркеров фиброза при резекциях печени, но у взрослых пациентов. Гепатэктомия – эффективный способ лечения при доброкачественных и злокачественных опухолях печени. Однако информативный метод оценки риска послеоперационных осложнений, а также потенциального восстановления печеночных функций до сих пор не разработан.

С этой целью Ueda J. с соавт. (2004), обследовав 360 пациентов, перенесших гепатэктомию в связи с гепатоцеллюлярной карциномой, выявили, что больные с нормальным уровнем ГК имели гораздо более высокую постоперационную общую выживаемость и безрецидивную выживаемость, а также лучшие показатели альбумина и протромбинового времени, чем субъекты с повышенной концентрацией исследуемого биомаркера. Полученные данные позволили авторам заключить, что предоперационное исследование сывороточной концентрации ГК целесообразно для оценки риска при гепатэктомии, поскольку этот маркер достоверно связан с функцией печени и прогнозом заболевания [124].

В свою очередь, Kubo S. с соавт. (2004), обследовав 251 пациента, подвергшихся резекции печени, установили, что концентрация К-IV (домена 7S) в сыворотке крови коррелировала с гистологической степенью активности гепатита и ФП. Высокое содержание К-IV в сыворотке крови исследователи расценили как фактор риска развития послеоперационной печеночной недостаточности. Так, ни один пациент с концентрацией К-IV в сыворотке крови <12 нг/мл не умер в постоперационном периоде от нарушения функций печени, а все 4 скончавшихся больных имели уровень биомаркера ≥12 нг/мл [69].

Wu J.S. с соавт. (2005) обследовали 32 пациентов, перенесших предоперационную эмболизацию портальной вены. Процентное увеличение объема левой доли печени отрицательно коррелировало с концентрацией 7S-

домена К-IV в сыворотке крови, определенной до эмболизации (r= –0,472, *p*=0,0063). У трех из четырех больных с высоким содержанием этого маркера (>8 нг/мл) процентное увеличение объема левой доли составило менее 100%, в связи с чем правая лобэктомия не была выполнена. Концентрация домена 7S в сыворотке крови коррелировала с гистологической активностью (r= 0,469, *p*=0,0061) и выраженностью ФП (r= 0,425, *p*=0,0145). На основании полученных результатов авторы пришли к выводу, что содержание домена 7S К-IV в сыворотке крови может предсказать эффективность эмболизации портальной вены, выполнение которой перед правой лобэктомией не оправдано у пациентов с высоким уровнем 7S-домена ввиду возможного риска недостаточного увеличения объема левой доли [131].

Ishii M. с соавт. (2020) в совсем недавнем ретроспективном когортном исследовании, включавшем 215 пациентов, перенесших гепатэктомию, показали, что уровень 7S-домена К-IV в сыворотке крови может быть индикатором ранней послеоперационной печеночной недостаточности и долгосрочного восстановления функции печени после хирургического вмешательства. Установлено, что время, необходимое для изменения показателей шкалы Чайлд-Пью с класса С до класса А и нормализации уровней общего билирубина и альбумина в сыворотке крови, было значительно короче у пациентов с концентрацией 7S-домена К-IV ≤ 6 нг/мл, чем у пациентов с уровнем > 6 нг/мл [59].

Qi X. с соавт. (2016) провели проспективное обсервационное исследование для оценки диагностической значимости К-IV и ГК в прогнозировании ЦП у 108 пациентов. Корреляционный анализ показал, что сывороточный уровень К-IV (ρ=0,658, *p*<0,001; ρ=0.368, *p*<0,001) и ГК (ρ=0,325, *p*=0,001; ρ=0.282, *p*=0,004) значимо коррелировал с показателями шкал Child-Pugh и оценки терминальных стадий заболеваний печени и прогноза жизни у пациентов с конечной стадией печеночной недостаточности (Model for End Stage Liver Disease, MELD), соответственно. Согласно логистическому регрессионному анализу, концентрация ГК (ОШ=1,00003, 95% ДИ=1,000004-1,000056, *p*=0,022) была

достоверно ассоциирована с 6-месячной смертностью от печеночной недостаточности [98].

К ограничению проведенного нами исследования следует отнести то, что определение сывороточных концентраций прямых биомаркеров фиброзирования было проведено у пациентов с хроническим поражением печени аутоиммунной этиологии, однако число обследованных нами пациентов, каждому из которых была проведена биопсия печени, составило 243, что, несмотря на редкость патологии в детском возрасте, достаточно велико и обуславливает статистическую значимость полученных результатов.

На следующем этапе исследования нами была рассчитана пропорциональная площадь коллагенов различных типов в ткани печени, при этом статистически значимые различия площади в зависимости от стадии ФП получены для К-IV. Установлено, что пропорциональная площадь К-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.

Далее при помощи методик дисперсионного анализа и бинарной логистической регрессии нами были нами были разработаны и описаны несколько прогностических моделей, которые учитывают сывороточные концентрации К-I, ГК, а также значения плотности печени, определяемые методом транзиентной эластографии. Полученные модели позволяют диагностировать высокий риск наличия ЦП, а также разграничить начальные стадии ФП (минимальную – F1 по METAVIR и умеренную – F2), с высокими значениями чувствительности и специфичности, что обуславливает их практическую значимость в неинвазивной диагностике стадийности структурных изменений печени при ХБП у детей.

Согласно исследованию Giannakeas N. с соавт. (2015), экстракция пропорциональной площади коллагена с использованием анализа цифровых изображений при биопсии печени обеспечивает эффективный способ оценки стадии заболевания печени [46].

Tsouros D.C. с соавт. (2017) предложен обновленный способ оценки площади коллагена в ткани печени: предлагается новая модификация кластеризации K-средних для сегментации изображений при биопсии печени. В частности, используется контролируемое ограничение движения центроидов. На первом этапе обучающий набор изображений используется для извлечения гиперкуба для каждого класса. Затем внутри каждого гиперкуба инициализируется один центроид. Для оценки предложенного метода используются 8 изображений биопсии печени, и результаты классификации вместе со значениями пропорциональной площади коллагена вычисляются для каждого изображения [123].

Сравнение плотности печени, определяемой методом МР-эластографии, и измерение площади коллагена с помощью МРТ предлагается в исследовании Zhu B. с соавт. (2017). В качестве референса была взята пропорциональная площадь коллагена, определенная гистологически, и оценка стадии ФП по Ishak. Визуализация коллагена при помощи МРТ позволяла разграничить начальные стадии ФП, тогда как МР-эластография показала статистически значимые чувствительность и специфичность при выраженном фиброзе. Полученные результаты позволили получить математическую модель с использованием многомерного дисперсионного анализа: она включала в себя значения МР-эластографии и площади коллагена, определенные с помощью МРТ, что привело к более точному определению стадии фиброзного прогрессирования. Согласно выводам исследования, молекулярная МРТ-визуализация коллагена дополняет МР-эластографию, и объединение двух методов в одном исследовании приводит к повышению диагностической точности для всех стадий фиброза [140].

Таким образом, анализ полученных данных показал, что прогностическая ценность прямых биомаркеров фиброзирования в диагностике стадийности фиброза печени при хронических формах ее патологии у детей достаточно велика. На основании выявленных взаимосвязей сывороточных концентраций К-I, К-IV и ГК с морфологической стадией фиброза доказано их участие в процессе фиброгенеза. Валидированные значения сывороточных концентраций К-I, К-IV и

ГК позволяют диагностировать не только выраженный ФП (F3) и ЦП (F4), но и, включенные в математические модели, дают возможность разграничения начальных стадий ФП (F1 и F2 по METAVIR).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что сывороточное содержание прямых биомаркеров фиброзирования отражает динамику их отложения в ткани печени.

Транзиентная эластография является доступным неинвазивным методом разграничения стадий фиброза с помощью определения плотности ткани печени.

Определение значений концентраций коллагенов I, IV типов и гиалуроновой кислоты в сыворотке крови информативно для диагностики стадий фиброзирования при хронических болезнях печени у детей.

Методика подсчета пропорциональной площади коллагена напрямую отражает динамику формирования фиброза с возможностью количественного определения волокон экстрацеллюлярного матрикса в ткани печени при хронической форме ее патологии.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галушко М. Ю., Ищенко А. Ю., Поздняков С. А., Бакулин И. Г. Способы оценки эффективности неинвазивных методов диагностики фиброза печени в подходе без «золотого» стандарта: прощание с биопсией печени? Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019; 170(10): 4-11.

2. Дворяковская Г.М., Ивлева С.А., Дворяковский И.В., Сурков А.Н., Потапов А.С., Гундобина О.С., Смирнов И.Е. Комплексная ультразвуковая диагностика в оценке паренхимы печени и стадий фиброза у детей с аутоиммунным гепатитом. Российский педиатрический журнал. 2016; 19(1): 4-8.

3. Дворяковский И.В., Ивлева С.А., Дворяковская Г.М., Сурков А.Н., Потапов А.С., Смирнов И.Е. Современные технологии ультразвуковой диагностики цирроза при хронических болезнях печени у детей. Российский педиатрический журнал. 2016; 19(4): 202-208.

4. Джоши Д., Кин Д., Бринд Э. Наглядная гепатология: учебное пособие, пер. с англ. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 168 с.

5. Ивлева С.А., Дворяковский И.В., Смирнов И.Е. Современные неинвазивные методы диагностики фиброза печени у детей. Российский педиатрический журнал. 2017; 5: 300-306.

6. Игнатович Т.В., Зафранская М.М.. Иммунопатогенез фиброза. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2019; 1: 6-17.

7. Изранов В.А., Казанцева Н.В., Мартинович М.В., Бут-Гусаим В.И., Степанян И.А. «Физические основы эластографии печени» Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. 2019, 2: 69-87.

8. Морозов С.В., Труфанова Ю.М., Павлова Т.В., Исаков В.А., Каганов Б.С. Применение эластографии для определения выраженности фиброза печени: результаты регистрационного исследования в России. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2008; 2: 40-48.

9. Пеняева Э.И., Камалов Ю.Р., Сенча А.Н. Ультразвуковое исследование с контрастным усилением в дифференциальной диагностике опухолевых образований печени. Медицинская визуализация. 2017; 21 (2): 36–52.

10. Сурков А. Н., Смирнов И. Е., Кучеренко А. Г., Потапов А. С., Туманова Е. Л. Динамика маркеров фиброзирования при хронических болезнях печени у детей. Российский педиатрический журнал. 2009; 3: 23-27.

11. Сурков А.Н., Намазова-Баранова Л.С., Вашакмадзе Н.Д., Геворкян А.К., Томилова А.Ю., Потапов А.С., Симонова О.И., Кузенкова Л.М., Баранов А.А. Транзиентная эластография – неинвазивный метод диагностики стадий фиброза печени у детей с редкими болезнями. Современные технологии в медицине. 2016; 8(3): 56–63.

12. Сурков А.Н., Смирнов И.Е., Кучеренко А.Г., Потапов А.С., Герасимова Н.П., Зиновьева А.Е. Взаимосвязи сывороточных маркеров фиброзирования с изменениями структурно-функционального состояния печени у детей. Российский педиатрический журнал. 2010; 2: 28-31.

13. Сурков А.Н., Смирнов И.Е., Потапов А.С., Кучеренко А.Г., Туманова Е.Л. Особенности мониторинга фиброза и цирроза у детей с хроническими болезнями печени. Педиатрическая фармакология. 2009; 6(2): 31-35.

14. Abel M., Teoh W.C., Leen E. Contrast evaluation of liver masses. Ultrasound Clin. 2014; 9(4): 605-623.

15. Afdhal NH, Bacon BR, Patel K, Lawitz EJ, Gordon SC, Nelson DR, et al. Accuracy of Fibroscan, compared with histology, in analysis of liver fibrosis in patients with hepatitis B or C: a United States multicenter study. Clin Gastroenterol Hepatol 2015; 13: 772-9.

16. Agbim U., Asrani S. Non-invasive assessment of liver fibrosis and prognosis: an update on serum and elastography markers, Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 2019, 13:4, 361-374.

17. Ahmad W., Ijaz B., Gull S., Asad S., Khaliq S., Jahan S., Sarwar M.T., Kausar H., Sumrin A., Shahid I., Hassan S. A brief review on molecular, genetic and imaging techniques for HCV fibrosis evaluation. Virol J 2011; 8: 53.

18. Attallah A.M., El-Far M., Ghaly M.F., Omran M.M., Albannan M.S., Attallah A.A., Shoghey T.M., Atrees M.M., Elbendary M.S., Farid K. Circulating levels of collagen III and MMP-1 in patients with chronic hepatitis C co-infected with hepatitis B virus. Br J Biomed Sci. 2017;74(2): 95-100.

19. Bamber J., Cosgrove D., Dietrich C.F. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 1: Basic principles and technology. Ultraschall Med 2013; 34: 169-184.

20. Batheja M., Vargas H., Silva A.M. Magnetic resonance elastography (MRE) in assessing hepatic fibrosis: performance in a cohort of patients with histological data. Abdom Imaging 2015; 40: 760-765.

21. Bavu E., Gennisson J.L., Couade M. Noninvasive in vivo liver fibrosis evaluation using supersonic shear imaging: a clinical study on 113 hepatitis C virus patients. Ultrasound Med Biol 2011; 37: 1361-1373.

22. Bota S., Herkner H., Sporea I. Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis. Liver Int 2013; 33: 1138-1147.

23. Boursier J., Brochard C., Bertrais S., Michalak S., Gallois Y., Fouchard-Hubert I., Oberti F., Rousselet M.C., Calès P. Combination of blood tests for significant fibrosis and cirrhosis improves the assessment of liver-prognosis in chronic hepatitis C. Aliment Pharmacol Ther 2014; 40: 178-188.

24. Boyle M., Tiniakos D., Schattenberg J.M., Ratziu V., Bugianessi E., Petta S., Oliveira C.P., Govaere O., Younes R., McPherson S., Bedossa P., Nielsen M.J., Karsdal M., Leeming D., Kendrick S., Anstee Q.M. Performance of the PRO-C3 collagen neo-epitope biomarker in non-alcoholic fatty liver disease. JHEP Rep. 2019;1(3): 188-198.

25. Brenner D.A. Reversibility of liver fibrosis. Gastroenterology & Hepatology. 2013; 9(11): 737-739.

26. Buzzetti E., Hall A., Ekstedt M., Manuguerra R., Misas M.G., Covelli C., Leandro G., Luong T., Kechagias S., Manesis E.K., Pinzani M., Dhillon A.P., Tsochatzis E.A. Collagen proportionate area is an independent predictor of long- term

outcome in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Aliment Pharmacol Ther. 2019; 49(9): 1214-1222.

27. Calvaruso V., Di Marco V., Bavetta M.G., Cabibi D., Conte E., Bronte F., Simone F., Burroughs A.K., Craxì A. Quantification of fibrosis by collagen proportionate area predicts hepatic decompensation in hepatitis C cirrhosis. Aliment Pharmacol Ther. 2015; 41(5): 477-86.

28. Caravan P., Das B., Dumas S., Epstein F.H., Helm P.A., Jacques V., Koerner S., Kolodziej A., Shen L., Sun W.-C., Zhang Z. Collagen-targeted MRI contrast agent for molecular imaging of fibrosis. Angew Chem Int Ed Engl. 2007;46(43):8171-3.

29. Castera L., Pinzani M. Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango? Gut 2010; 59: 861-866.

30. Castera L. Noninvasive assessment of liver fibrosis. Dig Dis. 2015; 33 (4): 498–503.

31. Caussy C., Bhargava M., Villesen IF., Gudmann NS., Leeming DJ., Karsdal MA., et al. Collagen Formation Assessed by N-Terminal Propeptide of Type 3 Procollagen Is a Heritable Trait and Is Associated With Liver Fibrosis Assessed by Magnetic Resonance Elastography. Hepatology. 2019; 70: 127-141.

32. Chon Y.E., Choi E.H., Song K.J. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis. PLoS One 2012; 7: e44930.

33. Chou R, Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review. Ann Intern Med 2013; 158: 807-820.

34. Chow A.M., Tan M., Gao D.S., Fan S.J., Cheung J.S., Man K., Lu Z.-R., Wu E.X. Molecular MRI of liver fibrosis by a peptide-targeted contrast agent in an experimental mouse model. Invest Radiol. 2013; 48(1): 46-54.

35. Cosgrove D., Piscaglia F., Bamber J. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 2: Clinical applications. Ultraschall Med 2013; 34: 238-253.

36. Daniels S.J., Leeming D.J., Eslam M., Hashem A.M., Nielsen M.J., Krag A. et al. ADAPT: An algorithm incorporating PRO-C3 accurately identifies patients with NAFLD and advanced fibrosis. Hepatology. 2019; 69: 1075-1086.

37. Ding N., Yu R.T., Subramaniam N., Sherman M.H., Wilson C., Rao R., et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. Cell. 2013; 153(3): 601-613.

38. Dooley S., ten Dijke P. TGF-beta in progression of liver disease. Cell Tissue Res. 2012; 347(1): 245-256.

39. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. J Hepatol. 2018; 63: 237–264.

40. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. J Hepatol. 2018; 69 (2): 461–511.

41. Fan X., Zhang Q., Li S., Lv Y., Su H., Jiang H., Hao Z.: Attenuation of CCl4-induced hepatic fibrosis in mice by vaccinating against TGF-β1. PLoS One 2013;190.

42. Faria S.C., Ganesan K., Mwangi I. MR imaging of liver fibrosis: current state of the art. Radiographics 2009; 29: 1615-1635.

43. Fitzpatrick E, Quaglia A, Vimalesvaran S, Basso MS, Dhawan A. Transient elastography is a useful noninvasive tool for the evaluation of fibrosis in paediatric chronic liver disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2013; 56:72-6.

44. Geng. Z., Zhao Q., Lin C. Transient Elastography and Ultrasonography: Optimal Evaluation of Liver Fibrosis and Cirrhosis in Patients with Chronic Hepatitis B Concurrent with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. BioMed Research International. 2019; 1: 1-10.

45. Gennisson J.L., Deffieux T., Fink M., Tanter M. Ultrasound elastography: principles and techniques. Diagn Interv Imaging. 2013; 94: 487-495.

46. Giannakeas N., Tsipouras M.G., Tzallas A.T., Kyriakidi K., Tsianou Z.E., Manousou P., Tsianos E.A clustering based method for collagen proportional area

extraction in liver biopsy images. 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). IEEE, 2015: 3097-3100.

47. Gressner OA, Gao C. Monitoring fibrogenic progression in the liver. Clin Chim Acta 2014; 433: 111-122.

48. Gudowska M., Gruszewska E., Panasiuk A., Cylwik B., Flisiak R., Świderska M., Szmitkowski M., Chrostek L. Hyaluronic acid concentration in liver diseases. Clin Exp Med. 2016; 16(4):523-528.

49. Gudowska, M., Cylwik, B., & Chrostek, L. The role of serum hyaluronic acid determination in the diagnosis of liver diseases. Acta Biochimica Polonica, 2017; 64(3), 451-457.

50. Guillot A., Hamdaoui N., Bizy A., Zoltani K., Souktani R., Zafrani E.S., et al. Cannabinoid receptor 2 counteracts interleukin-17-induced immune and fibrogenic responses in mouse liver. Hepatology. 2014; 59(1): 296-306.

51. Hammerich L., Heymann F., Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. Clin Dev Immunol. 2011; 2011: 345803.

52. Hansen J.F., Nielsen M.J., Nyström K., Leeming D.J., Lagging M., Norkrans G., Christensen P.B., Karsdal M. PRO-C3: a new and more precise collagen marker for liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Scand J Gastroenterol. 2018;53(1): 83-87.

53. Hasegawa T., Sasaki T., Kimura T., Hoki M., Okada A., Mushiake S., Yagi M, Imura K. Measurement of serum hyaluronic acid as a sensitive marker of liver fibrosis in biliary atresia. J Pediatr Surg. 2000; 35(11):1643-6.

54. Henderson N.C., Arnold T.D., Katamura Y., Giacomini M.M., Rodriguez J.D., McCarty J.H. et al. Targeting of alphav integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. Nat Med. 2013; 19(12): 1617-1624.

55. Hinz B. Myofibroblasts. Exp Eye Res 2016; 142: 56-70.

56. Hinz B., Phan S.H., Thannickal V.J., Prunotto M., Desmouliere A., Varga J., De Wever O., et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. Am J Pathol. 2012; 180(4): 1340-1355.

57. Huwart L, Sempoux C, Vicaut E et al. Magnetic resonance elastography for the noninvasive staging of liver fibrosis. Gastroenterology 2008; 135: 32-40.

58. Hwang, J. Y., Yoon, H. M., Kim, J. R., Lee, J. S., Jung, A. Y., Kim, K. M., Cho, Y. A. Diagnostic performance of transient elastography for liver fibrosis in children: a systematic review and meta-analysis. American Journal of Roentgenology, 2018: W257-W266.

59. Ishii M., Itano O., Shinoda M., Kitago M., Abe Y., Hibi T., Yagi H., Takeuchi A., Tsujikawa H., Abe T., Kitagawa Y. Pre-hepatectomy type IV collagen 7S predicts post-hepatectomy liver failure and recovery. World J Gastroenterol. 2020; 26(7): 725-739.

60. Israelsen M., Misas M.G., Koutsoumourakis A., Huang Y., Thiele M., Hall A., Rasmussen D., Covelli C. Buzzetti E., Prat L.I., Roccarina D., Detlefsen S., Luong T.V., Quaglia A., Krag A., Jeffrey G., Pinzani M., Tsochatzis E.A. Collagen proportionate area predicts clinical outcomes in patients with alcohol-related liver disease. Aliment Pharmacol Ther. 2020; 52(11-12): 1728-1739.

61. Iwaisako K., Jiang C., Zhang M., Cong M., Moore-Morris T.J., Park T.J., Liu X., et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111(32): E3297-3305.

62. Jacqueline A. Bachofner Piero V. Valli Arne Kröger Irina Bergamin Patrizia Künzler Adriana Baserga Dominique Braun Burkhardt Seifert Anja Moncsek Jan Fehr David Semela Lorenzo Magenta Beat Müllhaupt Benedetta Terziroli Beretta-Piccoli Joachim C. Mertens. Direct antiviral agent treatment of chronic hepatitis C results in rapid regression of transient elastography and fibrosis markers fibrosis-4 score and aspartate aminotransferase-platelet ratio index. Liver International, 2017; 37: 369-376.

63. Jović M., Nikolić I., Todorović V., Petrović A., Petrović V., Mojsilović M., Denčić T. Distribution of Collagen I, III, and IV and Laminin in the Human Liver during Prenatal Development. Cells Tissues Organs. 2018; 205(3): 164-177.

64. Jung Hwan Yu and Jung Il Lee. Current role of transient elastography in the management of chronic hepatitis B patients. Ultrasonography. 2017 Apr; 36(2): 86–94.

65. Karsdal M.A., Henriksen K., Nielsen M.J., Byrjalsen I., Leeming D.J., Gardner S. et al. Fibrogenesis assessed by serological type III collagen formation identifies patients with progressive liver fibrosis and responders to a potential antifibrotic therapy. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2016; 311: G1009-G1017.

66. Karsdal M.A., Nielsen S.H., Leeming D.J., Langholm L.L., Nielsen M.J., Manon-Jensen T., Siebuhr A., Gudmann N.S., Rønnow S., Sand J.M., Daniels S.J., Mortensen J.H., Schuppan D. The good and the bad collagens of fibrosis - Their role in signaling and organ function. Adv Drug Deliv Rev. 2017; 121: 43-56.

67. Kim, J. R., Suh, C. H., Yoon, H. M., Lee, J. S., Cho, Y. A., & Jung, A. Y. The diagnostic performance of shear-wave elastography for liver fibrosis in children and adolescents: a systematic review and diagnostic meta-analysis. European radiology. 2018; 28(3): 1175-1186.

68. Kisling A., Lust R.M., Katwa L.C. What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease? Life Sci. 2019; 228: 30-34.

69. Kubo S., Tsukamoto T., Hirohashi K., Tanaka H., Shuto T., Takemura S., Yamamoto T., Uenishi T., Ogawa M., Kinoshita H. Correlation between preoperative serum concentration of type IV collagen 7s domain and hepatic failure following resection of hepatocellular carcinoma. Ann Surg. 2004; 239(2): 186-93.

70. La A. Non invasive diagnosis of fibrosis in NAFLD, how reliable is it? EASL postgraduate course metabolic liver disease. Vienna, Austria: The International Liver Congress, 2015: 24-25

71. Lambrecht J., van Grunsven L.A., Tacke F. Current and emerging pharmacotherapeutic interventions for the treatment of liver fibrosis. Expert Opin Pharmacother. 2020; 21(13):1637-1650. doi: 10.1080/14656566.2020.1774553.

72. Lavallard VJ, Bonnafous S, Patouraux S, Saint-Paul MC, Rousseau D, Anty R, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P. Serum markers of hepatocyte death

and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. PLoS One 2011; 6: e17599. DOI: 10.1371/journal.pone.0017599

73. Lebensztejn D.M., Wierzbicka A., Socha P., Pronicki M., Skiba E., Werpachowska I., Kaczmarski M. Cytokeratin-18 and hyaluronic acid levels predict liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. Acta Biochim Pol. 2011;58(4):563-6.

74. Lee CK, Mitchell PD, Raza R, Harney S, Wiggins SM, Jonas MM. Validation of Transient Elastography Cut Points to Assess Advanced Liver Fibrosis in Children and Young Adults: The Boston Children's Hospital Experience. J Pediatr. 2018; 198: 84-89.

75. Leow W.-Q., Bedossa P., Liu F., Wei L., Lim K.-H., Wan W.-K., Ren Y., Chang J.P.-E., Tan C.-K., Wee A., Goh G.B.-B. An Improved qFibrosis Algorithm for Precise Screening and Enrollment into Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) Clinical Trials. Diagnostics (Basel). 2020;10(9):643.

76. Leung V, Shen J, Wong V et al. Quantitative elastography of liver fibrosis and spleen stiffness in chronic hepatitis B carriers: comparison of shear-wave elastography and transient elastography with liver biopsy correlation. Radiology 2013; 269: 910-918.

77. Li F, Zhu CL, Zhang H, Huang H, Wei Q, Zhu X, Cheng XY. Role of hyaluronic acid and laminin as serum markers for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis B. Braz J Infect Dis 2012; 16: 9-14.

78. Li Y., Wang J., Asahina K. Mesothelial cells give rise to hepatic stellate cells and myofibroblasts via mesothelial-mesenchymal transition in liver injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110(6): 2324-2329.

79. Lin ZH, Xin YN, Dong QJ, Wang Q, Jiang XJ, Zhan SH, Sun Y, Xuan SY. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: an updated meta-analysis. Hepatology 2011; 53: 726-736.

80. Longo-Santos L.R., Teodoro W.R., de Mello E.S., Velosa A.P.P., Parra E.R., Capelozzi V.L., Tannuri U. Early type I collagen deposition is associated with prognosis in biliary atresia. J Pediatr Surg. 2016; 51(3): 379-85.

81. Loomba R, Wolfson T, Ang B et al. Magnetic resonance elastography predicts advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a prospective study. Hepatology 2014; 60: 1920-1928.

82. Lua I., Li Y., Zagory J.A., Wang K.S., French S.W., Sevigny J., Asahina K. Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers. J Hepatol 2016; 64(5): 1137-1146.

83. Luo Y., Oseini A., Gagnon R., Charles E.D., Sidik K., Vincent R., Collen R., Idowu M., Contos M.J., Mirshahi F., Daita K., Asgharpour A., Siddiqui M.S., Jarai G., Rosen G., Rose Christian R., Sanyal A.J. An Evaluation of the Collagen Fragments Related to Fibrogenesis and Fibrolysis in Nonalcoholic Steatohepatitis. Sci Rep. 2018;8(1): 12414.

84. Lurie Y, Webb M, Cytter-Kuint R, Shteingart S, Lederkremer GZ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. World J Gastroenterol 2015; 21(41): 11567-11583.

85. Mak K.M., Mei R. Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. Anat Rec (Hoboken). 2017; 300(8):1371-1390.

86. Martin J, Khatri G, Gopal P, Singal AG. Accuracy of ultrasound and noninvasive markers of fibrosis to identify patients with cirrhosis. Dig Dis Sci 2015; 60: 1841-1847.

87. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Gut 2010; 59: 1265-1269.

88. Meng F., Wang K., Aoyama T., Grivennikov S.I., Paik Y., Scholten D., et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. Gastroenterology. 2012; 143(3): 765-776.e3.

89. Montesi S.B., Désogère P., Fuchs B.C., Caravan P. Molecular imaging of fibrosis: recent advances and future directions. J Clin Invest. 2019; 129(1): 24-33.

90. Nassef Y.E., Shady M.M.A., Galal E.M., Hamed M.A. Performance of diagnostic biomarkers in predicting liver fibrosis among hepatitis C virus-infected Egyptian children. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(7): 887-93.

91. Nishikawa H., Enomoto H., Yoh K., Iwata Y., Hasegawa K., Nakano C., Takata R., Kishino K., Shimono Y., Sakai Y., Nishimura T., Aizawa N., Ikeda N., Takashima T., Ishii A., Iijima H., Nishiguchi S. Serum hyaluronic acid predicts protein-energy malnutrition in chronic hepatitis C Medicine (Baltimore). 2016; 95(24): e3920.

92. Papastergiou V, Stampori M, Lisgos P, Pselas C, Prodromidou K, Karatapanis S. Durability of a sustained virological response, late clinical sequelae, and long-term changes in aspartate aminotransferase to the platelet ratio index after successful treatment with peginterferon/ribavirin for chronic hepatitis C: a prospective study. Eur J Gastroenterol Hepatol 2013; 25: 798-805.

93. Pinzani M. Pathophysiology of Liver Fibrosis. Dig Dis 2015; 33(4): 492-497.

94. Pokorska-Spiewak, M., Dobrzeniecka, A., Lipinska, M., Tomasik, A., Aniszewska, M., & Marczynska, M. Liver Fibrosis Evaluated With Transient Elastography in 35 Children With Chronic Hepatitis C Virus Infection. The Pediatric Infectious Disease Journal; 2021: 40(2), 103-108.

95. Poynard T, Moussalli J, Munteanu M, Thabut D, Lebray P, Rudler M, Ngo Y, Thibault V, Mkada H, Charlotte F, Bismut FI, Deckmyn O, Benhamou Y, Valantin MA, Ratziu V, Katlama C. Slow regression of liver fibrosis presumed by repeated biomarkers after virological cure in patients with chronic hepatitis C. J Hepatol 2013; 59: 675-683.

96. Poynard T, Munteanu M, Luckina E et al. Liver fibrosis evaluation using real-time shear wave elastography: applicability and diagnostic performance using methods without a gold standard. J Hepatol 2013; 58: 928-935.

97. Poynard T, Ngo Y, Munteanu M, Thabut D, Ratziu V. Noninvasive Markers of Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis B. Curr Hepat Rep 2011; 10: 87-97.

98. Qi X., Liu X., Zhang Y., Hou Y., Ren L., Wu C., Chen J., Xia C., Zhao J., Wang D., Zhang Y., Zhang X., Lin H., Wang H., Wang J., Cui Z., Li X., Deng H., Hou

F., Peng Y., Wang X., Shao X., Li H., Guo X. Serum Liver Fibrosis Markers in the Prognosis of Liver Cirrhosis: A Prospective Observational Study. Med Sci Monit. 2016; 22: 2720-30.

99. Razek AA, Abdalla A, Omran E, et al. Diagnosis and quantification of hepatic fibrosis in children with diffusion weighted MR imaging. Eur J Radiol 2011; 78: 129-134.

100. Rosenberg W.M.C., Voelker M., Thiel R., Becka M., Burt A., Schuppan D., Hubscher S., Roskams T., Pinzani M., Arthur M.J.P. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. Gastroenterol. 2004;127(6):1704–1713.

101. Rowland, M., McGee, A., Broderick, A., Drumm, B., Connolly, L., Daly, L. E., Bourke, B. Repeatability of transient elastography in children. Pediatric research. 2020; 88(4): 587-592.

102. Salarian M., Turaga R.C., Xue S., Nezafati M., Hekmatyar K., Qiao J., Zhang Y., Tan S., Ibhagui O.Y., Hai Y., Li J., Mukkavilli R., Sharma M., Mittal P., Min X., Keilholz S., Yu L., Qin G., Farris A.B., Liu Z.-R., Yang J.J. Early detection and staging of chronic liver diseases with a protein MRI contrast agent. Nat Commun. 2019; 10(1): 4777.

103. Saltik-Temizel I.N., Koçak N., Ozen H., Demir H. Serum hyaluronic acid concentrations in children with cirrhosis. Indian J Gastroenterol. 2004; 23(4):129-30.

104. Geng-lin Sandrin L., Fourquet B., Hasquenoph JM. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. Ultrasound in Medicine & Biology. 2003. 29(12): 1705-1713.

105. Scholten D., Weiskirchen R. Questioning the challenging role of epithelial-to-mesenchymal transition in liver injury. Hepatology. 2011; 53(3): 1048-1051.

106. Schuppan D., Muhammad Ashfaq-Khan M., Yang A.T., Kim Y.O. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. Matrix Biol. 2018; 68-69:435-451.

107. Seki E., Brenner D. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2015; 22(7): 512-518.

108. Seki E., Schwabe R.F. Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways. Hepatology. 2015; 61(3): 1066-1079.

109. Singh S, Venkatesh SK, Wang Z et al. Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. Clin Gastroenterol Hepatol 2015; 13: 440-451.

110. Sohrabi M., Tosi M.N., Azar P., Nikkhah M., Bayani Z., Zarei M., Ajdarkosh H. The Impact of Transient Elastography in the Assessment and Follow-up of Patients with HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B Virus Infection. Govaresh. 2019, Vol. 24, №2: 117-111.

111. Stasi C., Tsochatzis E.A., Hall A., Rosenberg W., Milani S., Dhillon A.P., Pinzani M. Comparison and correlation of fibrosis stage assessment by collagen proportionate area (CPA) and the ELF panel in patients with chronic liver disease. Digestive and Liver Disease. 2018; 51(7): 1001-1007.

112. Staub F, Tournoux-Facon C, Roumy J et al. Liver fibrosis staging with contrast-enhanced ultrasonography: prospective multicenter study compared with METAVIR scoring. Eur Radiol 2009; 19: 1991-1997.

113. Stefanelli V.L., Barker T.H. The evolution of fibrin-specific targeting strategies. J Mater Chem B. 2015;3(7):1177-1186.

114. Sukowati C.H.C., Anfuso B., Fiore E., Ie S.I., Raseni A., Vascotto F., Avellini C., Mazzolini G., Tiribelli C. Hyaluronic acid inhibition by 4-methylumbelliferone reduces the expression of cancer stem cells markers during hepatocarcinogenesis. Sci Rep. 2019; 9(1): 4026.

115. Sun Y., Jialing Zhou J., Wu X., Chen Y., Piao H., Lu L., Ding H., Nan Y., Jiang W., Wang T., Liu H., Ou X., Wee A., Theise N.D., Jia J., You H. Quantitative assessment of liver fibrosis (qFibrosis) reveals precise outcomes in Ishak "stable" patients on anti-HBV therapy. Sci Rep. 2018; 8(1): 2989.ith chronic liver disease. Digestive and Liver Disease. 2018; 51(7): 1001-1007.

116. Sun Y., Zhou J., Wang L., Wu X., Chen Y., Piao H., Lu L., Jiang W., Xu Y., Feng B., Nan Y., Xie W., Chen G., Zheng H., Li H., Ding H., Liu H., Lv F., Shao C., Wang T., Ou X., Wang B., Chen S., Wee A., Theise N.D., You H., Jia J. New

classification of liver biopsy assessment for fibrosis in chronic hepatitis B patients before and after treatment. Hepatology. 2017; 65(5): 1438-1450.

117. Tacke F., Trautwein C. Mechanisms of liver fibrosis resolution. J Hepatol 2015; 63(4): 1038-1039.

118. Tacke F., Weiskirchen R. An update on the recent advances in antifibrotic therapy. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2018; 12(11):1143-1152.

119. Tapper EB, Krajewski K, Lai M, Challies T, Kane R, Afdhal N, Lau D. Simple non-invasive biomarkers of advanced fibrosis in the evaluation of non-alcoholic fatty liver disease. Gastroenterol Rep (Oxf) 2014; 2: 276-280.

120. Taura K., Miura K., Iwaisako K., Osterreicher C.H., Kodama Y., Penz-Osterreicher M., Brenner D.A. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. Hepatology 2010; 51(3):1027-1036.

121. Teufel-Schäfer, U., Flechtenmacher, C., Fichtner, A., Hoffmann, G. F., Schenk, J. P., & Engelmann, G. Transient elastography correlated to four different histological fibrosis scores in children with liver disease. European Journal of Pediatrics 2021, 1-8.

122. Tsochatzis E, Gurusamy K, Ntaoula S et al. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy. J Hepatol 2011; 54: 650-659.

123. Tsouros D.C., Smyrlis P.N., Tsipouras M.G., Tsalikakis D.G., Giannakeas N., Tzallas A.T., Manousou, P. Automated collagen proportional area extraction in liver biopsy images using a novel classification via clustering algorithm. IEEE 30th International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS). IEEE, 2017: 30-34.

124. Ueda J., Yoshida H., Mamada Y., Taniai N., Masato M., Hirakata A., Kawano Y., Shimizu T., Kanda T., Takata H., Uchida E.. Evaluation of the Impact of Preoperative Values of Hyaluronic Acid and Type IV Collagen on the Outcome of Patients with Hepatocellular Carcinoma After Hepatectomy. J Nippon Med Sch. 2018; 85(4): 221-227.

125. Usluer G, Erben N, Aykin N, Dagli O, Aydogdu O, Barut S, Cevik F, Ormen B. Comparison of non-invasive fibrosis markers and classical liver biopsy in chronic hepatitis C. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 1873-1878.

126. Valva P, Casciato P, Diaz Carrasco JM, Gadano A, Galdame O, Galoppo MC, Mullen E, De Matteo E, Preciado MV. The role of serum biomarkers in predicting fibrosis progression in pediatric and adult hepatitis C virus chronic infection. PLoS One 2011; 6: e23218.

127. Venkatesh SK, Yin M, Takahashi N et al. Non-invasive detection of liver fibrosis: MR imaging features vs. MR elastography. Abdom Imaging 2015; 40: 766-775.

128. Voss B., Rauterberg J., Allam S., Pott G. Distribution of collagen type I and type III and of two collagenous components of basement membranes in the human liver. Pathol Res Pract. 1980; 170(1-3): 50-60.

129. Weiskirchen R., Tacke F. Liver Fibrosis: From Pathogenesis to Novel Therapies. Dig Dis 2016; 34(4): 410-422.

130. Wu J.S., Kubo S., Tanaka H., Shuto T., Takemura S., Tsukamoto T., Hirohashi K., Kinoshita H. Type IV collagen 7s domain as a predictor of poor efficacy of portal vein embolization before major hepatectomy. Surg Today. 2005; 35(1): 41-6.

131. Wu, J. S., Kubo, S., Tanaka, H., Shuto, T., Takemura, S., Tsukamoto, T., Kinoshita, H. Type IV collagen 7s domain as a predictor of poor efficacy of portal vein embolization before major hepatectomy. Surgery today. 2005; 35(1): 41-46.

132. Xiangdong Hu, Lanyan Qiu, Dong Liu, Linxue Qian. Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography for non‐invasive evaluation of hepatic fibrosis in chronic hepatitis B and C patients: a systematic review and meta-analysis. Med Ultrason, 2017, Vol. 19, No 1, 23-31.

133. Xie S-B., Yao J-L., Zheng R-Q., Peng X-M., Gao Z-L. Serum hyaluronic acid, procollagen type III and IV in histological diagnosis of liver fibrosis. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2003; 2(1): 69-72.

134. Yin M, Venkatesh SK. Ultrasound or MR elastography of liver: which one shall I use? Abdom Radiol (NY). 2018 Jul;43(7): 1546–1551.

135. Zhang C.Y., Yuan W.G., He P., Lei J.H., Wang C.X. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. World J Gastroenterol 2016; 22(48): 10512-10522.

136. Zheng J, Guo H, Zeng J et al. Two-dimensional shear-wave elastography and conventional US: the optimal evaluation of liver fibrosis and cirrhosis. Radiology 2015; 275: 290-300.

137. Zhou I.Y., Catalano O.A., Caravan P. Advances in functional and molecular MRI technologies in chronic liver diseases. J Hepatol. 2020;73(5):1241-1254.

138. Zhu X, Wang LC, Chen EQ, Chen XB, Chen LY, Liu L, Lei XZ, Liu C, Tang H. Prospective evaluation of FibroScan for the diagnosis of hepatic fibrosis compared with liver biopsy/AST platelet ratio index and FIB-4 in patients with chronic HBV infection. Dig Dis Sci 2011; 56: 2742-2749. DOI: 10.1007/s10620-011-1659-1

139. Zhu Y., Wang B., Shen F., Wang A., Jia J., Ma H. Dynamic evolution of MMP-13, TIMP-1, type I and III collagen and their interaction in experimental liver fibrosis [Article in Chinese]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2004; 12(10):612-5.

140. Zhu B., Wei L., Rotile N., Day H., Rietz T., Farrar C. T., Caravan P. Combined magnetic resonance elastography and collagen molecular magnetic resonance imaging accurately stage liver fibrosis in a rat model. Hepatology. 2017; 65(3): 1015-1025.

141. Ziol M., Handra-Luca A., Kettaneh A., Christidis C., Mal F., Kazemi F., et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 2005;41:48-54.