

**Е.Я. ГЛАЗКОВА**

Медицинский институт «РЕАВИЗ»  
Кафедра клинической медицины

**РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В  
НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ  
У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С**

Научные руководители – доктор медицинских наук Е.С. Малова,  
профессор В.Г. Морозов

**Работа посвящена совершенствованию неинвазивной диагностики фиброза печени у больных хроническим гепатитом С путем введения в арсенал существующих методов иммунологических тестов. Было установлено, что иммунологические тесты проявляли большую диагностическую значимость в дебюте фиброзных изменений. Для диагностики значимого фиброза печени (стадия F3 по шкале METAVIR) и цирроза печени был предложен новый интегральный показатель – Иммунофибротест, который превышал по диагностической точности традиционные методы неинвазивной оценки фиброзного процесса.**

*Ключевые слова: хронический гепатит С, фиброз печени, неинвазивная диагностика, иммунологические показатели, Иммунофибротест.*

**E.Y.GLAZKOVA**

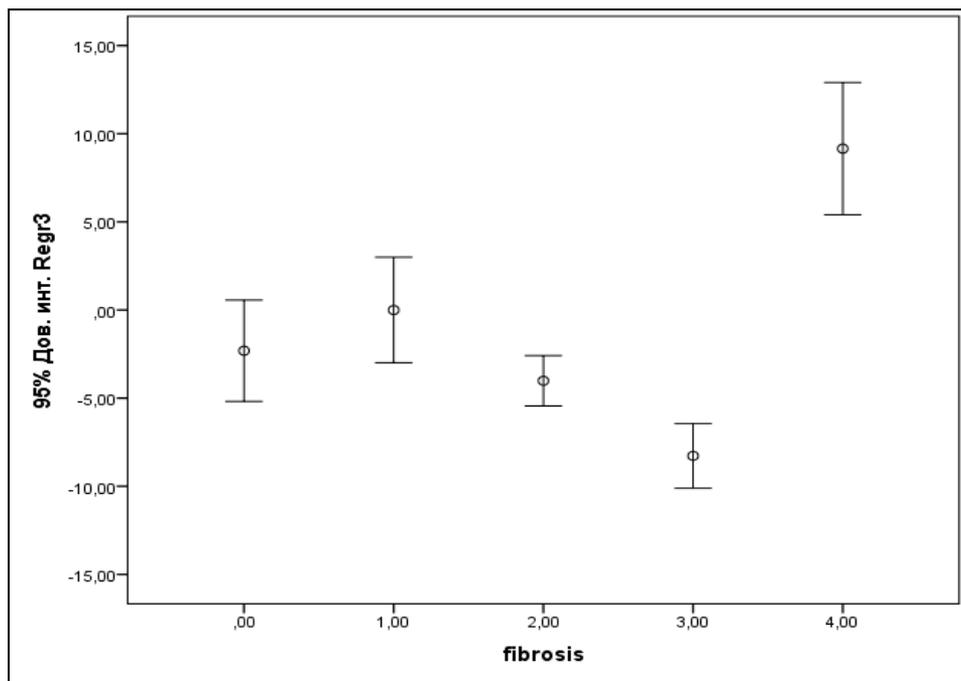
**THE ROLE OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN  
NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF HEPATIC FIBROSIS IN  
PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C**

**The work is devoted to the improvement of non-invasive diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C by introducing immunological tests into the arsenal of existing methods. It was found that immunological tests showed great diagnostic significance at the beginning of fibrotic changes. For the diagnosis of stage F3 of liver fibrosis (METAVIR scale) and liver cirrhosis a new Immunofibrotest, which exceeded the diagnostic accuracy of traditional non-invasive methods, was proposed.**

*Keywords: chronic hepatitis C, liver fibrosis, non-invasive diagnosis, immunological parameters, Immunofibrotest.*

Вирусный гепатит С – социально значимое заболевание, характеризующееся широкой распространенностью в мире, склонностью к хроническому течению при высокой частоте неблагоприятных исходов в цирроз печени и первичный рак печени<sup>1,2,3</sup>.

отбор пациентов для специфической (противофиброзной) терапии, позволяет контролировать эффективность лечения<sup>4</sup>. На протяжении многих лет стандартом диагностики фиброза и цирроза печени у больных гепатитом С остается гистологическое ис-



**Рис. 1. 95% доверительные интервалы для Иммунофибротеста у больных ХГС на разных стадиях фиброза печени**

Развитию неблагоприятных исходов хронического гепатита С (ХГС) закономерно предшествуют фиброзные изменения в печени. Оценка степени фиброзных изменений в печени при ее поражении является очень важным диагностическим этапом, поскольку она определяет прогноз хронического заболевания, помогает произвести

следование биоптатов печени<sup>5,6</sup>. В то же время сама манипуляция забора биоптата печени (биопсия) является небезопасной, имеет множество осложнений, может представлять опасность для жизни пациентов и характеризуется рядом несовершенств, влияющих на точность воспроизведе-

<sup>1</sup> Козлов В.К., Стельмах В.В., Радченко В.Г. Хронический гепатит С: иммунопатогенез, аспекты диагностики и современная стратегия комплексного лечения // Руководство для врачей. СПб.: Альтер Эго. – 2009. С.172.

<sup>2</sup> Lavanchy D. The global burden of hepatitis C // Liver Int. – 2009. – Vol. 29, Suppl.1. – P. 74–81.

<sup>3</sup> Sebastiani G., Gkouvatsos K., Pantopoulos K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis // World J Gastroenterol. – 2014. Vol. 20. N.32. P. 11033–11053.

<sup>4</sup> Исаков В. А. Как определять выраженность фиброза печени и зачем? // Клин. гастроэнтерол. гепатол. Русское издание. – 2008. Т. 1. № 2. С. 72–75.

<sup>5</sup> Майер К.П. Гепатит и последствия гепатита. – М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2004. – 720 с.

<sup>6</sup> Непомнящих Д.Л., Айдагулова С.В., Непомнящих Г.И. Биопсия печени: Патоморфогенез хронического гепатита и цирроза. – М.: Издательство РАМН. – 2006. – 368 с.

ния результата<sup>7,8</sup>. С этих позиций неинвазивные способы оценки стадии фиброза печени могут представлять существенный интерес для исследователей в качестве альтернативы биопсии печени<sup>9,10</sup>.

Доказано, что фиброзные процессы в печени обусловлены как самим вирусным возбудителем, так и иммунологическими механизмами в организме больного<sup>11</sup>. В связи с этим актуальной задачей является внедрение иммунологических методов в неинвазивную диагностику фиброза печени у больных ХГС<sup>12</sup>.

Цель исследования: определить роль иммунологических показателей в неинвазивной диагностике фиброза печени у больных хроническим гепатитом С.

Материалы и методы исследования. Обследовано 205 пациентов в возрасте от 18 до 60 лет с верифицированным диагнозом ХГС в фазе репликации вируса. Контрольную группу составили 24 здоровых человека. Все пациенты были разделены на 5 групп в соответствии со стадиями

фиброза печени, установленными в ходе гистологического исследования биоптатов печени с оценкой по шкале METAVIR: (1) F0 – 17, (2) F1 – 96, (3) F2 – 26, (4) F3 – 22 и (5) F4 – 44 пациента. Больным ХГС на каждой стадии фиброзного процесса методом проточной цитофлуориметрии определялось: (1) общее число Т-клеток (CD3+), В-лимфоцитов (CD19+), естественных киллеров (CD16+/CD56+); (2) субпопуляционный состав Т-лимфоцитов, включая Т-хелперы (CD3+/CD4+), ЦТЛ (CD3+/CD8+), ЕКТ (CD3+/CD56+), регуляторные Т-клетки (CD3+/FoxP3+); (3) субпопуляционный состав естественных киллеров (CD56bright, CD56dim) и ЕКТ (CD4+, CD8+, DN); (4) доля активированных Т-лимфоцитов (CD3+/CD25+); (5) доля ЕК, экспрессирующих киллингибирующие рецепторы иммуноглобулиновой (CD158a) и лектиновой (CD94+) природы, активирующие рецепторы иммуноглобулиновой (CD158h, NKp46, CD16) и лектиновой (NKG2D) природы, маркеры внутриклеточных цитолитических гранул (CD107a).

Кроме того, в каждой группе устанавливался уровень иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA, IgE) и цитокинов профиброзного (ИФН $\alpha$ , ТФР $\beta$ , ИЛ-13) и противofiброзного (ИЛ-10, ИЛ-12, ИФН $\gamma$ , ФНО $\alpha$ ) действия в сыворотке или плазме крови иммуноферментным методом.

Статистическая обработка данных проводилась на основе пакета статистических программ SPSS, версия 17. Вычислялись 95% доверительные интервалы показателей, для подтверждения диагностической значимости лабораторных критериев проводилось построение ROC-кри-

<sup>7</sup> Лобзин, Ю.В., Жданов К.В., Волжанин В.М., Гусев Д.А. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение. – СПб.: Фолиант. – 2003. – С. 192.

<sup>8</sup> Lutz H.N., Gassler N., Tischendorf F.W. et al. Doppler ultrasound of hepatic blood flow for noninvasive evaluation of liver fibrosis compared with liver biopsy and transient elastography // Dig. Dis. Sci. – 2012. Vol. 57. №8. – P. 2222-2230.

<sup>9</sup> Boursier, J., Brochard C., Bertrais S. et al. Combination of blood tests for significant fibrosis and cirrhosis improves the assessment of liver-prognosis in chronic hepatitis C // Aliment Pharmacol Ther. 2014; 40(2): 178-188.

<sup>10</sup> Rossi E., Adams L.A., Ching H.L. et al. High biological variation of serum hyaluronic acid and Hepascore, a biochemical marker model for the prediction of liver fibrosis // Clin. Chem. Lab. Med. – 2013. Vol. 51. №5. P. 1107-1114.

<sup>11</sup> Малова Е.С., Ющук Н.Д., Балмасова И.П., Шмелева Е.В. CD56+ лимфоциты и иммунопатогенез хронического гепатита С // Иммунология, – 2010. Т. 31. № 6. С. 310-315.

<sup>12</sup> Павлов Ч.С., Глушенков Д.В., Коновалова О.Н., Ивашкин В.Т. Сфера клинического применения неинвазивных методов оценки фиброза печени: результаты собственных исследований в многопрофильном стационаре // Клиническая медицина. – 2009. Т.87. N11. С. 40-45

Таблица 1

Оценка соответствия результатов информативных иммунологических тестов для диагностики фиброза печени данным биопсии печени у больных ХГС на разных стадиях фиброза

Стадия фиброза печени (биопсия)	Диагностический тест/индекс	Диагностический и значимый диапазон величин	AUROC	
			при сравнении с остальными стадиями	при сравнении с последующей стадией
1	2	3	4	5
F0	CD3+	>70%	0,279	0,735
	CD19+	>0,23*10 <sup>9</sup> клеток/л	0,342	0,748
	CD3+/- CD56+/- CD4+	>8%	0,203	0,755
	CD16+/- CD56+	>0,2*10 <sup>9</sup> клеток/л	0,502	0,586
	CD56+/- NKG2D+	<95%	0,660	0,697
	CD56+/- CD107a+	<80%	0,750	0,696
	Иммунофибротест	-5,0-1,0	0,405	0,613
F1	CD3+/- CD4+	>47%	0,430	0,392
	CD3+/- CD8+	<23%	0,614	0,654
	ИРИ	>2,0	0,370	0,630
	CD3+/- CD25+	<15%	0,654	0,815
	CD16+/- CD56+	>0,2*10 <sup>9</sup> клеток/л	0,652	0,571
	CD3+/- CD56+/- CD8+	>65%	0,669	0,698
	CD3+/- CD56+/- DN	>28%	0,427	0,753
	CD56+/- CD94+	>48%	0,434	0,812
	CD56+/- NKG2D+	>95%	0,479	0,685
	CD56+/- CD107a+	>93%	0,531	0,616
	ТФРβ	>10 пг/л	0,641	0,782
	Иммунофибротест	-3,0-3,0	0,502	0,688
1	2	3	4	5
F2	CD3+	<68%	0,434	0,812
	CD3+/- CD4+	<44%	0,479	0,685
	CD3+/- CD56+	>4%	0,461	0,612
	CD3+/- CD56+/- CD4+	>40%	0,461	1,000

	CD3+/ CD56+/ CD8+	<45%	0,306	0,971
	CD3+/ CD56+/ DN	<25%	0,410	0,900
	CD16+/ CD56+	>11%	0,820	0,814
	CD56+/ CD94+	<37%	0,774	1,000
	CD56+/ NKG2D+	<95%	0,685	0,778
	CD56+/ CD107a+	<77%	0,689	0,945
	ТФРβ	<6 пг/л	0,807	1,000
	Иммунофибротест	<-5,0	0,657	0,932
F3	CD3+	>72%	0,218	0,828
	CD3+/ CD4+	>47%	0,405	0,762
	ИРИ	>2,4	0,411	0,660
	CD3+/ CD25+	>32%	0,220	0,998
	CD19+	<13%	0,635	0,656
	CD3+/ CD56+	<5%	0,786	0,711
	CD3+/ CD56+/ CD4+	<35%	0,904	0,837
	CD3+/ CD56+/ CD8+	>50%	0,139	0,847
	CD16+/ CD56+	<11%	0,645	0,743
	CD56+/ CD94+	>37%	0,185	0,788
	CD56+/ NKG2D+	<90%	0,351	0,524
	ТФРβ	>6 пг/л	0,102	0,709
Иммунофибротест	<-5,0	0,912	1,000	
F4	CD3+	>72%	0,701	-
	CD3+/ CD4+	>47%	0,687	-
	ИРИ	>2,4	0,648	-
	CD3+/ CD25+	>32%	0,874	-
	CD19+	<13%	0,398	-
	CD16+/ CD56+	<11%	0,330	-
	CD56+/ NKG2D+	<90%	0,446	-
	Иммунофибротест	>5,0	1,000	-

вых и определялись площади под ними – AUROC.

Результаты исследования и их обсуждение. Проводя анализ 95% доверительных интервалов каждого иммунологического показателя, мы получили целый комплекс иммунологических сдвигов на каждой стадии

фиброзного процесса. В связи с этим возникла идея интегрировать все эти показатели с помощью уравнения регрессии, которое позволило бы приписать каждому информативному параметру свой весовой коэффициент соответственно вкладу в развитие фиброзного процесса.

В полученное уравнение линейной регрессии программой были включены не все информативные показатели. В конечном итоге оно имело вид:  $0,271 * [CD3+/CD4+] + 0,399 * [CD3+/CD25+] + 0,245 * [CD56+/CD94+] - 0,352 * [CD56+/NKG2D+]$  и получило название Иммунофибротеста. Критерии эффективности Иммунофибротеста определялись путем расчета его 95% доверительных интервалов (рисунок 1), а также построения ROC-кривых для каждого варианта использования диагностического метода.

Было показано, что у больных ХГС на стадиях F0-F2 Иммунофибротест по диагностической значимости уступал отдельным иммунологическим показателям. В то же время на стадии F3 – одной из важнейших стадий с точки зрения проведения лечебных мероприятий – Иммунофибротест при величине ниже 5,0 проявлял максимальную диагностическую точность как при сравнении со всеми остальными стадиями, так и по сравнению со стадией цирроза печени, когда его диагностическая значимость, выраженная величиной AUROC, приближалась к абсолютной. Столь же абсолютной была диагностическая точность этого интегрального показателя Иммунофибротеста (AUROC=1,0) в случае использования его для диагностики цирроза печени, когда Иммунофибротест при величине выше 5,0 превышал по диагностической эффективности все отдельные иммунологические показатели.

Для окончательного формирования комплекса иммунологических тестов для постадийной диагностики фиброза печени, использовались

ROC-кривые. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Так, иммунологический показатель процента CD107a+ клеток среди ЕК и ЕКТ при значениях ниже 80% оказался единственным тестом, позволяющим даже при первичном обследовании больного ХГС диагностировать стадию F0. Что касается перехода от отсутствия фиброза к его дебюту (F1), то в этом случае наиболее диагностически значимыми были число Т- и В-лимфоциты, CD4+ ЕКТ. Для определения стадии F1 в случае первичного обследования больного ХГС эффективно можно использовать число активированных Т-клеток >15% и CD8+ ЕКТ >65%. Мониторинг перехода с этой стадии на стадию F2 мог быть осуществлен при высоком диагностическом значении уровня ТФРβ, который повышается выше 11 пг/л. Стадия F2 с точки зрения первичного обследования больных ХГС неинвазивными методами характеризуется процентом CD94+ ЕК в крови <37%, уровнем ТФРβ <6 пг/л и содержанием ЕК среди лимфоцитов крови >11%. Переход со стадии F2 на F3 может быть зарегистрирован при условии повышения числа ЕКТ >40%, при этом уровень ТФРβ повторно падает <6 пг/л. В этом случае высокую информативность проявляет Иммунофибротест при падении значений <-5. Перечень тестов для первичной идентификации стадии F3 сравнительно велик и включает число CD4+ ЕКТ <35% и особенно Иммунофибротеста <-5. Для целей мониторинга перехода стадии F3 в цирроз печени также может использоваться Иммунофибротест, который меняется наиболее значительно и становится выше 5.

Таким образом, проведенные исследования показали, что иммунологические показатели занимают достойное место в неинвазивной диагностике стадий фиброза печени у больных ХГС. И врач, устанавливая стадию фиброзного процесса, может использовать целый комплекс иммунологических тестов, при этом у каждого теста имеется свое предназначение в диагностическом процессе, а наиболее информативным средством мониторинга больного ХГС на поздних стадиях фиброзного процесса может служить Иммунофибротест.

### **Выводы.**

1. Иммунологические показатели как неинвазивные критерии перехода из одной стадии фиброза печени в другую можно широко использовать не только для мониторинга больного хроническим гепатитом С, но и для первичного определения практически любой стадии фиброза печени.

2. К числу информативных отдельных иммунологических параметров для неинвазивной диагностики фи-

броза печени у больных хроническим гепатитом С относятся относительное число CD3+CD25+ клеток среди лимфоцитов крови, относительное число CD16+/CD56+ клеток среди лимфоцитов крови, доля CD4+ и CD8+ клеток среди CD3+/CD56+ лимфоцитов крови, доля CD94+ и CD107a+ клеток среди CD56+ лимфоцитов крови, уровень ТФРβ в крови в соответствующем диапазоне значений.

3. Такие информативные иммунологические параметры, как относительное число CD3+CD4+ клеток среди лимфоцитов крови, относительное число CD3+CD25+ клеток среди лимфоцитов крови, доля CD94+ и NKG2D+ клеток среди CD56+ лимфоцитов крови могут служить основой для их интегративной оценки в виде Иммунофибротеста.

4. Иммунофибротест в определенных диапазонах величин с очень высокой диагностической эффективностью может быть использован для диагностики стадий F3-F4 у больных хроническим гепатитом С.