

*Joanna Kozłowska, Teresa Łoch\*, Joanna Jabłońska, Janusz Cianciara*

## BIOCHEMICZNE WYKŁADNIKI WŁÓKNIENIA W PRZEWLEKŁYM ZAPALENIU WĄTROBY I W MARSKOŚCI WĄTROBY O ETIOLOGII WIRUSOWEJ

Klinika Hepatologii i Nabytych Niedoborów Immunologicznych AM  
w Warszawie

Kierownik Kliniki: J. Cianciara

\* Zakład Immunopatologii Instytutu Chorób Zakaźnych  
i Pasożytniczych AM w Warszawie

\*\* Kierownik Zakładu: M. Radkowski

*W pracy podjęto próbę oceny przydatności oznaczania stężenia wybranych składników macierzy pozakomórkowej w surowicy jako biochemicznych wykładników włóknienia, u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby i w różnych stadiach zaawansowania pozapalne marskości wątroby.*

### WSTĘP

Włóknienie wątroby jest kluczowym procesem wiodącym do marskości tego narządu. Rozwija się u chorych z przewlekłymi schorzeniami wątroby, a jego patomechanizm jest taki sam niezależnie od ich etiologii (1). Chociaż stan wiedzy na temat włóknienia wątroby dynamicznie się rozwija, nadal nie znamy sposobów skutecznego jego leczenia, a jedyną uznaną metodą oceny włóknienia jest badanie histopatologiczne wycinka wątroby uzyskanego drogą biopsji. Badanie to nie jest jednak pozbawione pewnych ograniczeń, wynikających z inwazyjnej natury zabiegu, zróżnicowanej i niejednorodnej dystrybucji zmian patologicznych w wątrobie, jak również ich subiektywnej interpretacji. Z powodu zaburzeń krzepnięcia, w przebiegu niewydolności wątroby często istnieją przeciwwskazania do wykonywania biopsji wątroby. Dlatego podejmuje się próby ominięcia tych problemów poprzez ocenę włóknienia wątroby za pomocą testów nieinwazyjnych, opartych o badanie stężenia niektórych składników macierzy pozakomórkowej (ang.: extracellular matrix - ECM) lub produktów ich metabolizmu w surowicy krwi. Markery te nie są wprawdzie narządowo specyficzne, jednak ich wartości w przebiegu chorób pozawątrobowych (włóknienie narządów, nowotwory, zaburzenia metaboliczne, stany zapalne) nie są zazwyczaj tak wysokie, jak w chorobach wątroby. Ponadto inne choroby związane ze wzmożonym metabolizmem ECM można często wykluczyć badaniem klinicznym.

W pracy oznaczano stężenie wybranych składników ECM w surowicy chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby oraz w różnych stadiach pozapalnej marskości wątroby.

Na podstawie piśmiennictwa światowego (2, 3, 4, 5) do badań wybrano trzy składniki ECM, z których każdy należy do innej grupy związków: PIIP - N-końcowy peptyd prokolagenu typu III, LPI - pepsyno-oporny fragment lamininy, należącej do glikoprotein oraz HA - kwas hialuronowy, będący glikozaminoglikanem.

Każdy z wybranych wykładników ukazuje proces włóknienia i uszkodzenia wątroby w nieco innym aspekcie. Zastosowanie kombinacji kilku biochemicznych wykładników metabolizmu ECM zwiększa ich wartość diagnostyczną i prognostyczną w ocenie włóknienia wątroby.

### MATERIAŁ I METODY

W badaniu uczestniczyło 91 chorych - 75 osób z pozapalną marskością wątroby (mw) i 16 z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby (pwzw). Wśród chorych z mw 41 osób było zakażonych HBV, a 34 osoby - HCV. W grupie chorych z pwzw u 7 osób stwierdzono zakażenie HBV, a u 9 osób - zakażenie HCV. Chorych z mw podzielono na trzy grupy: A (n=24), B(n=31) i C(n=20) - zgodnie ze stopniem zaawansowania choroby, według kryteriów Childa-Pugh (6). Chorzy z pwzw stanowili grupę odniesienia (grupa O).

U wszystkich chorych oznaczano stężenie badanych markerów (PIIP, LPI i HA) w surowicy, przy użyciu komercyjnych testów radioimmunologicznych dla PIIP i LPI oraz radiometrycznego dla HA.

U chorych z pwzw wykonywano biopsję wątroby i oceniano aktywność zapalną („grading”) oraz włóknienie („staging”) metodą półilościową.

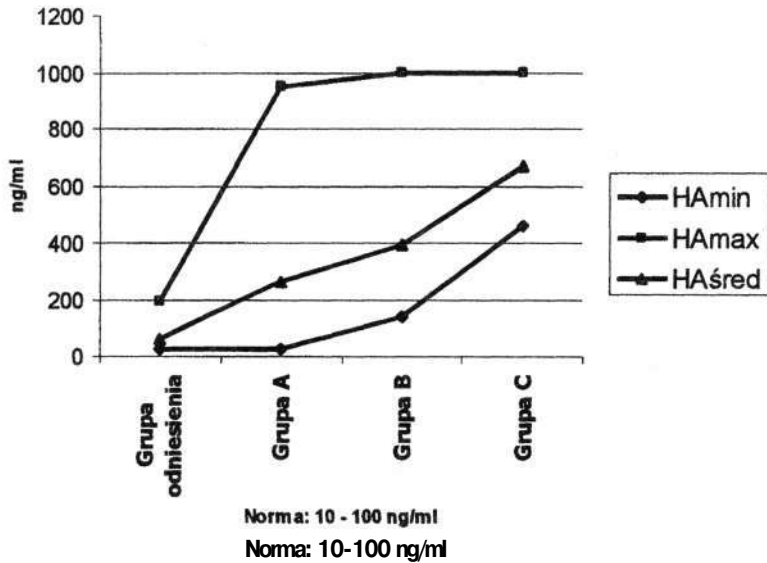
### WYNIKI

Średnie stężenia: LPI i HA u chorych w grupie O mieściły się w granicach normy. We wszystkich grupach chorych z mw (grupy: A, B i C) średnie stężenia: PIIP, LPI i HA przekraczały wartości prawidłowe.

Średnie wartości badanych wykładników w grupach chorych z mw: A, B i C rosły w miarę progresji choroby. Najbardziej istotne różnice dotyczyły wartości HA (ryc. 1). Poziomy istotności różnic pomiędzy poszczególnymi badanymi grupami chorych: O i A, A i B, B i C wynosiły kolejno:  $p < 0,00002$ ,  $p < 0,02$  i  $p < 0,0001$ . Wśród chorych z grupy O tylko u 1 osoby stwierdzono nieprawidłową wartość stężenia HA, zaś spośród wszystkich chorych z mw podwyższone wartości tego parametru obserwowano u 68 osób (91%).

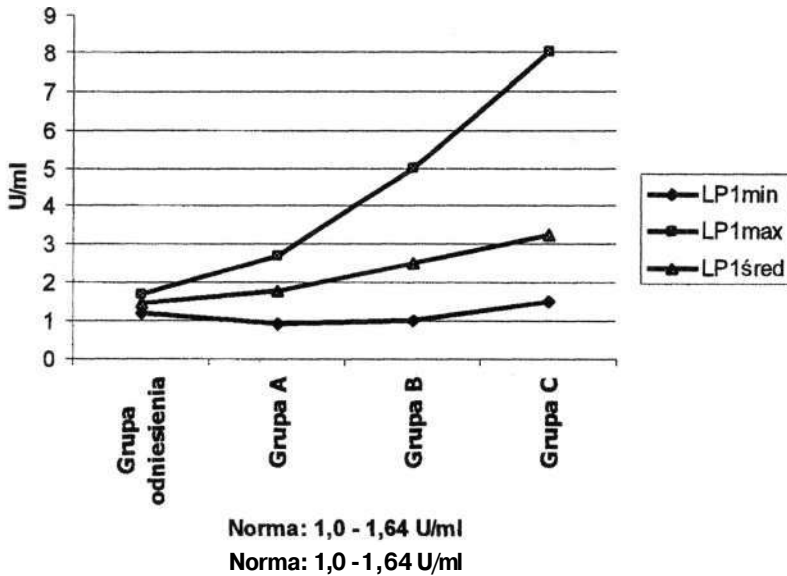
Stężenie LPI (ryc. 2) istotnie różniło się pomiędzy grupami: O i B ( $p < 0,000004$ ), A i B ( $p < 0,0006$ ) oraz A i C ( $p < 0,00004$ ) - przy stałej tendencji rosnącej w miarę zaawansowania choroby. Różnica stężeń LPI pomiędzy grupami O i mw(ABC) (grupa wszystkich chorych z mw) była znaczna przy  $p < 0,000004$ .

Stężenie PIIP (ryc. 3) było istotnie wyższe w grupie O w porównaniu z grupą A ( $p < 0,006$ ). Różnica rozkładów wartości PIIP w grupach O i mw(ABC) nie była istotna. Średnie stężenie PIIP rosło w miarę zaawansowania mw, ale istotną różnicę zanotowano tylko pomiędzy grupami chorych: A i B ( $p < 0,003$ ).



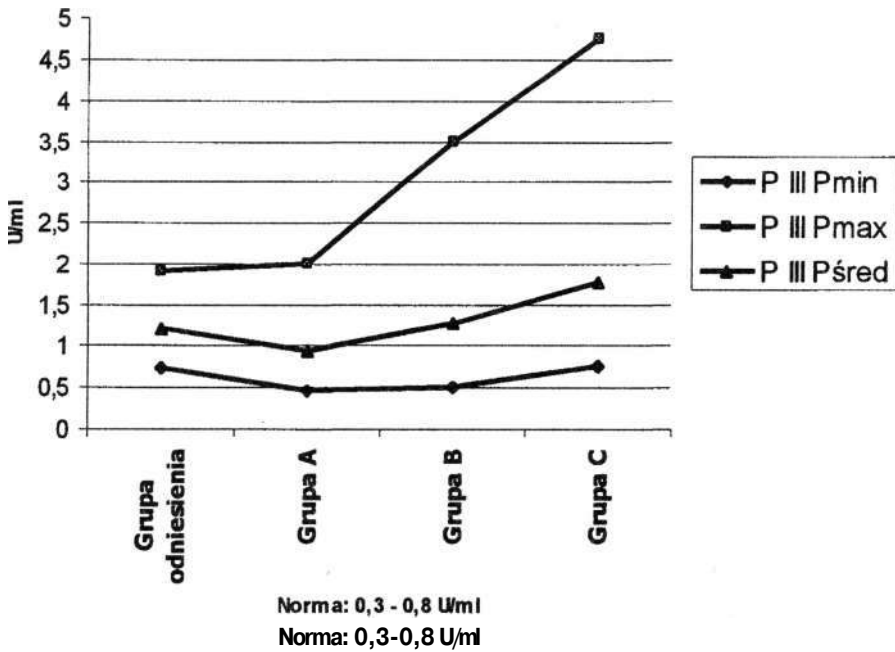
Ryc. 1. Wartości średnie stężenia HA w surowicy, przedstawione wraz z pasmem zmienności tego parametru (wartości minimalne i maksymalne), w poszczególnych grupach badanych chorych

Fig. 1. Mean values of serum HA concentration presented with the variability band (minimal and maximal values) in the groups of studied patients



Ryc. 2. Wartości średnie stężenia LPI w surowicy, przedstawione wraz z pasmem zmienności tego parametru (wartości minimalne i maksymalne), w poszczególnych grupach badanych chorych

Fig. 2. Mean values of serum LPI concentration presented with the variability band (minimal and maximal values) in the groups of studied patients



Ryc. 3. Wartości średnie stężenia PIIP w surowicy, przedstawione wraz z pasmem zmienności tego parametru (wartości minimalne i maksymalne), w poszczególnych grupach badanych chorych

Fig. 3. Mean values of serum PIIP concentration presented with the variability band (minimal and maximal values) in the groups of studied patients

Zaobserwowano dużą zmienność wartości badanych parametrów włóknienia, szczególnie w grupach chorych w bardziej zaawansowanych stadiach mw (grupy B i C).

Stwierdzono istotne korelacje pomiędzy wartościami PIIP i HA w grupie O ( $r=0,6$ ;  $p<0,015$ ) i w grupie A ( $r=0,52$ ;  $p<0,009$ ), PIIP i LPI w grupie A ( $r=0,76$ ;  $p<0,00004$ ) oraz HA i LPI w grupie A ( $r=0,67$ ;  $p<0,0007$ ).

Istotnie wyższe wartości wszystkich badanych wykładników stwierdzono u chorych zakażonych HCV w porównaniu z chorymi zakażonymi HBV w obrębie grupy A marskości wątroby (dla PIIP  $p<0,005$ , dla LPI  $p<0,009$ , a dla HA  $p<0,006$ ). W obrębie pozostałych badanych grup (O, B i C) różnic takich nie zaobserwowano.

U części badanych chorych z mw (13 osób) wykonano dwukrotnie oznaczenia wartości PIIP, LPI i HA w odstępie 2 lat. Stwierdzono tendencję do wzrostu poziomu HA z biegiem czasu, silniejszą u chorych z szybszą progresją choroby. Mała liczba przypadków uniemożliwia ich analizę statystyczną.

## DYSKUSJA

PIIP jest najpowszechniej stosowanym spośród badanych wykładników włóknienia. Początkowo PIIP uważany był wyłącznie za wykładnik fibrogenezy (7), co ma uzasadnienie teoretyczne, ponieważ peptydy prokolagenu uwalniane są przy udziale specyficznych propeptydaz w procesie syntezy włókien kolagenowych w przestrzeni pozakomórkowej. Badania wielu autorów wykazały dobrą korelację pomiędzy stęże-

niem PIIIP a rozległością włóknienia wątroby ocenianą badaniem histopatologicznym (8, 9, 10).

W badaniach własnych nie stwierdzono wyraźnej korelacji pomiędzy wynikami oznaczania stężenia PIIIP, a zaawansowaniem choroby wątroby. Na podstawie badania PIIIP nie możemy odróżnić chorych z marskością wątroby od tych z przewlekłym zapaleniem wątroby, bez cech marskości. Inni autorzy również opisują jedynie słabą korelację PIIIP z włóknieniem i marskością wątroby (11,12,13). Poziom PIIIP koreluje raczej z aktywnością choroby niż rozległością procesu włóknienia (12, 14). Stan zapalny wątroby i proces włóknienia są prawdopodobnie niezależnymi czynnikami wpływającymi na poziom PIIIP w surowicy. W przebiegu większości chorób wątroby patologiczne procesy martwicy, zapalenia i włóknienia zwykle występują jednocześnie i trudno na podstawie oznaczania stężenia PIIIP wnioskować o każdym z nich oddzielnie. Wyniki własnych badań są zgodne z danymi z piśmiennictwa, które wskazują, że proces włóknienia i stopień zaawansowania choroby nie są jedynymi czynnikami wpływającymi na poziom PIIIP w surowicy. Tak więc wartość oznaczania stężenia PIIIP w surowicy chorych w różnych okresach marskości wątroby, jako markera włóknienia tego narządu, jest dyskusyjna.

Laminina, jako główny glikoproteinowy składnik błon podstawnych, może być uważana za wykładnik ich metabolizmu. Wielu autorów opisuje korelację poziomu LP1 z nasileniem włóknienia wątroby badanym metodą histopatologiczną (9,10,15). Wykazano także związek podwyższonego poziomu LP1 w surowicy z zaawansowaniem procesu chorobowego wątroby i jej niewydolnością (15, 16). Stężenie LP1 może być czynnikiem odróżniającym chorych z włóknieniem wątroby bez marskości od tych z marskością wątroby (15, 16). Wyniki badań przeprowadzonych w niniejszej pracy są podobne do cytowanych powyżej. Średnia wartość LP1 u chorych z pwzw mieściła się w granicach normy, a różnica stężeń LP1 w grupach chorych z pwzw i mw była znacząca ( $p < 0,000004$ ). Potwierdza to cytowane powyżej spostrzeżenia innych autorów, że LP1 może być czynnikiem wyróżniającym dla chorych z mw, w porównaniu z chorymi z włóknieniem wątroby bez cech marskości.

W pracy Körnera i wsp. stwierdzono, że wartość stężenia LP1 (także HA) w surowicy może być stosowana jako marker prognostyczny w uzupełnieniu kryteriów Childa-Pugh w przebiegu mw (16). Adler i wsp. również wykazali, że oznaczanie LP1 w surowicy ma istotną wartość prognostyczną dla oceny 1-rocznego przeżycia chorych z mw (17). Własne obserwacje potwierdzają wartość oznaczania LP1 u chorych w różnych stadiach zaawansowania marskości wątroby. Stwierdzono, że średnie stężenie tego parametru w grupach marskości A, B i C wzrastało proporcjonalnie do progresji choroby, jednakże zmienność wyników LP1 w obrębie grupy narastała wraz z przechodzeniem do kolejnych grup zaawansowania marskości. Obserwacja ta potwierdza złożoność procesów odpowiedzialnych za ostateczny wynik oznaczenia tego biochemicznego markera włóknienia.

Kwas hialuronowy wychwytywany jest z krwioobiegu przez wątrobowe komórki śródbłonna naczyń zatokowych. Wzrost jego stężenia we krwi może odzwierciedlać zatem zarówno wzmoczoną syntezę towarzyszącą procesowi włóknienia, jak i osłabioną degradację, która może być efektem obniżonej perfuzji zatok oraz uszkodzenia śródbłonna w procesie kapilaryzacji naczyń zatokowych (18). Wiele prac potwierdza

korelację poziomu HA z nasileniem włóknienia (mierzonym metodą półilościową - „staging”) u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby (11, 19).

W przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby stwierdza się istotny wzrost stężenia HA u chorych z marskością wątroby, w porównaniu do tych, u których nie doszło do marskości (11, 14). We wczesnych etapach włóknienia nie obserwuje się wzrostu poziomu HA w surowicy (20), natomiast w późniejszych fazach rozwoju pzw oznaczanie HA daje na drodze badania nieinwazyjnego istotną dodatkową informację o zaawansowaniu włóknienia wątroby. Oberti i wsp. wykazali, że stężenie HA jest dobrym czynnikiem prognostycznym rozwoju mw, przydatnym w rozpoznaniu marskości u 91-94% chorych z wyrównaną przewlekłą chorobą wątroby (21).

Z przedstawionych badań własnych wynika, że stężenie HA rośnie wraz ze wzrostem zaawansowania marskości wątroby. Różnice stężeń HA pomiędzy grupami marskości A i B oraz B i C są istotne statystycznie, a u chorych z pzw wartości tego parametru są istotnie niższe niż u chorych z marskością wątroby, nawet w stosunku do grupy A. Mimo dużej zmienności wyników u chorych z grup B i C, HA jest parametrem, który w niniejszej pracy najlepiej korelował ze stopniem zaawansowania choroby wątroby. Podobnie, korelację poziomu HA ze stopniem niewydolności wątroby, stwierdzają także inni autorzy (16, 22).

Murawaki i wsp., badając chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B i typu C, nie stwierdzili zależności wyników oznaczania biochemicznych wykładników włóknienia w surowicy od rodzaju wirusa wywołującego chorobę (23).

W niniejszej pracy podjęto również próbę ustalenia, czy zakres zmian wyników badań markerów włóknienia ma związek z określonym czynnikiem etiologicznym - HBV i HCV - odpowiedzialnym za marskość pozapalną wątroby. Wartości wszystkich badanych wykładników włóknienia u chorych zakażonych HBV różniły się istotnie od wartości tych wykładników u chorych zakażonych HCV tylko w obrębie grupy chorych z mw w klasie A (wg Childa-Pugh). Stężenia: PIIIP, LP1 i HA były wyższe u chorych zakażonych HCV. W obrębie pozostałych badanych grup (O, B i C) nie stwierdzono wpływu rodzaju wirusa na wartości PIIIP, LP1 ani HA.

Poczynione spostrzeżenia są zachętą do dalszych badań nad złożonymi procesami progresji włóknienia wątroby z uwzględnieniem różnych wirusowych czynników etiologicznych.

## WNIOSKI

1. Stężenia biochemicznych wykładników włóknienia: peptydu prokolagenu typu III, lamininy i kwasu hialuronowego w surowicy chorych z marskością pozapalną wątroby ulegają stopniowemu wzrostowi w miarę progresji choroby - co wskazuje na udział tych czynników w złożonym procesie włóknienia wątroby.
2. Oznaczanie stężenia kwasu hialuronowego i lamininy w surowicy może być pomocne w klinicznej ocenie zaawansowania marskości wątroby. Może również stanowić cenne uzupełnienie kryteriów Childa-Pugh.
3. Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy jest istotnie wyższe u chorych z marskością pozapalną wątroby niż u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby. Oznaczanie wartości tego wykładnika może być pomocne w odróżnianiu marskości wątroby od przewlekłego zapalenia wątroby.

4. U chorych we wczesnym stadium marskości pozapalnej wątroby (klasa A wg Childa-Pugh) wartości oznaczanych markerów włóknienia są wyższe u osób zakażonych HCV w porównaniu z zakażonymi HBV. Spostrzeżenie to może być zachętą do dalszych badań nad złożonymi procesami włóknienia w wątrobie w odniesieniu do różnych wirusowych czynników etiologicznych.

*J Kozłowska, T Łoch, J Jabłońska, J Cianciara*

#### BIOCHEMICAL MARKERS OF FIBROSIS IN CHRONIC HEPATITIS AND LIVER CIRRHOISIS OF VIRAL ORIGIN

##### SUMMARY

**Objective:** Usefulness of three selected extracellular matrix components as markers of hepatic fibrosis in patients with chronic viral hepatitis and postinflammatory liver cirrhosis. **Methods:** 91 patients with chronic HBV or HCV infection were divided into four groups; chronic hepatitis - group O; cirrhosis classes A, B and C (Child-Pugh classification) - groups A, B and C, respectively. The serum levels of: N-terminal peptide of type III procollagen (PIIIP), laminin (LP1) and hyaluronic acid (HA) in these patients were measured using commercial radioimmuno-logical and radiometric tests. **Results:** The mean values of the investigated markers increased in patients with cirrhosis according to the stage of the disease (thus group A showed the least level while the highest was exhibited in group C). Between all the groups: O, A, B and C, HA was the marker showing the greatest difference. The only marker with a greater mean level in group O than group A, was PIIIP. Substantially higher levels of the investigated markers were found in the patients with HCV than in those with HBV, but only within group A. **Conclusions:** 1) The values of the studied markers increased in various degree with the cirrhosis progress. 2) LP1 and HA measurements have particular value in the clinical estimation of cirrhotic advancement. 3) HA measurement may be helpful in differentiating between cirrhosis and chronic hepatitis. 4) The course of hepatic fibrosis may be influenced by the etiological factor as the values of the studied markers are higher in patients with HCV than in patients with HBV, in the early stage of cirrhosis.

##### PIŚMIENNICTWO

1. Bissell DM. Wound repair and hepatic fibrosis: an overview of the biology and treatment. In: Arroyo V, Bosch J, Bruguera M, Rodes J, eds. Therapy in liver diseases. The pathophysiological basis of therapy. Barcelona: Masson, 1997; 157-61.
2. Plebani M, Burlina A. Biochemical markers of hepatic fibrosis. Clin Biochem 1991;24:219-39.
3. Risteli L, Risteli J. Noninvasive methods for detection of organ fibrosis. In: Rojkind M, ed. Focus on connective tissue in health and disease. Boca Raton: CRC Press, 1990:61-98.
4. Schuppan D, Stölzel U, Oesterling C, i in. Serum assays for liver fibrosis. J Hepatol 1995; 22(Suppl.2):82-8.
5. Trinchet JC. Clinical use of serum markers of fibrosis in chronic hepatitis. J Hepatol 1995; 22(Suppl.2):89-95.
6. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. In: Child CG, ed. The liver and portal hypertension. Philadelphia: WB Saunders, 1964;50-72.
7. Frei A, Zimmermann A, Weigand K. The N-terminal propeptide of collagen type III in serum reflects activity and degree of fibrosis in patients with chronic liver disease. Hepatology 1984;4:830-4.
8. Rojkind M. The blue glass and the predictive value of serum amino-terminal propeptide of type III procollagen as a marker of liver fibrosis. Hepatology 1984;4:977-8.

9. Capra F, Casaril M, Gabrielli GB, i in. a-interferon in the treatment of chronic viral hepatitis: effects on fibrogenesis serum markers. *J Hepatol* 1993;18:112-8.
10. Teran JC, Mullen KD, Hoofnagle JH, i in. Decrease in serum levels of markers of hepatic connective tissue turnover during and after treatment of chronic hepatitis B with interferon- $\alpha$ . *Hepatology* 1994;19:849-56.
11. Guechot J, Laudat A, Loria A, i in. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem* 1996;42:558-63.
12. Roberts FD, Sandford NL, Bradbear RA, i in. Serum procollagen-III-peptide: failure to reflect the extent of hepatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1986;1:27-32.
13. McCullough AJ, Stassen WN, Wiesner RH, i in. Serum type III procollagen peptide concentrations in severe chronic active hepatitis: relationship to cirrhosis and disease activity. *Hepatology* 1987;7:49-54.
14. Ramadori G, Zóhrens G, Manns M, i in. Serum hyaluronate and type III procollagen aminoterminal propeptide concentration in chronic liver disease. Relationship to cirrhosis and disease activity. *Eur J Clin Invest* 1991;21:323-30.
15. Kropf J, Gressner AM, Negwer A. Efficacy of serum laminin measurement for diagnosis of fibrotic liver diseases. *Clin Chem* 1988;34:2026-30.
16. Körner T, Kropf J, Gressner AM. Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: markers of progression with high prognostic value. *J Hepatol* 1996;25:684-8.
17. Adler M, Verset D, Bouhdid H, i in. Prognostic evaluation of patients with parenchymal cirrhosis. *J Hepatol* 1997;26:642-9.
18. Ueno T, Inuzuka S, Torimura T, i in. Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization. *Gastroenterology* 1993;105:475-81.
19. Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, i in. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores - Comparison with serum markers. *J Hepatol* 1998;28:439-46.
20. Mattsson L, Lindqvist U, Weiland O, i in. Serum levels of aminoterminal propeptide of type III procollagen and hyaluronan during resolving and nonresolving post-transfusion non-A, non-B hepatitis. *Scand J Infect Dis* 1990;22:11-7.
21. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, i in. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:1609-16.
22. Gibson PR, Fraser JRE, Brown TJ, i in. Hemodynamic and liver function predictors of serum hyaluronan in alcoholic liver disease. *Hepatology* 1992;6:1054-9.
23. Murawaki Y, Ikuta Y, Nishimura Y, i in. Serum markers for connective tissue turnover in patients with chronic hepatitis B and chronic hepatitis C: a comparative analysis. *J Hepatol* 1995;23:145-52.

**Adres autorów:**

Joanna Kozłowska

Klinika Hepatologii i Nabytych Niedoborów Immunologicznych AM

ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa

tel. 0-prefiks-22 632-06-04, fax 631-05-35