

Małgorzata Ingot¹, Aleksandra Szymczak¹, Agnieszka Haloń²

PATOGENEZA I METODY OCENY WŁÓKNIENIA WĄTROBY WE WSPÓLZAKAŻENIU HIV/HCV

PATHOGENESIS AND METHODS EVALUATION OF LIVER FIBROSIS IN HIV/HCV CO-INFECTION

¹Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych Akademii Medycznej we Wrocławiu

²Katedra i Zakład Patomorfologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono podstawy patogenezy włóknienia wątroby w przebiegu współzakażenia HIV/HCV. Szczegółowo omówiono czynniki wpływające na progresję włóknienia zależne od postępującej immunosupresji oraz działania leków antyretrowirusowych. Zaprezentowano aktualne możliwości diagnostyczne, w tym rolę badania histopatologicznego bioptatu wątroby oraz metod nieinwazyjnych - surowicznych markerów włóknienia i elastometrii.

Słowa kluczowe: *współzakażenie HIV/HCV, włóknienie, surowicze markery włóknienia*

ABSTRACT

The paper presents the pathogenetic base of liver fibrosis in HIV/HCV co-infection. The factors influencing on fibrosis progression, dependent on progressive immunosuppression and the effects of antiretroviral drugs are discussed in details. Current diagnostic possibilities, including the role of histopathologic evaluation of liver tissue and non-invasive methods – serum fibrosis markers and elastometry – are presented.

Key words: *co-infection HIV/HCV, fibrosis, serum fibrosis markers*

WSTĘP

Zakażenia ludzkim wirusem upośledzenia odporności (HIV) i wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) szerzą się podobnymi drogami: przez kontakt z krwią i kontakty seksualne, co sprawia, że często mamy do czynienia z jednoczesnym występowaniem obu zakażeń. W naturalnej historii zakażenia HCV dochodzi do postępującego włóknienia wątroby, co ostatecznie może doprowadzać do przebudowy marskiej narzędu. Udowodniono, że progresja procesu włóknienia u chorych zakażonych HCV ze współzakażeniem HIV następuje ponad 3 razy szybciej niż u chorych bez zakażenia HIV. Wynika to między innymi ze skutków nasilonej replikacji wirusów hepatotropowych związanej z pogłębiającym się deficytem immunologicznym, hepatotoksycznego działania stosowanych leków, zaburzeń metabolicznych rozwijających się w czasie wieloletniego stosowania terapii antyretrowirusowej (HAART), a także częstego w tej grupie chorych nadużywania alkoholu i/lub środków odurzających.

Celem pracy jest przedstawienie zarysu patogenezy włóknienia w przebiegu zakażenia HCV/HIV z uwzględnieniem czynników wpływających na szybszą ewolucję choroby zależnych od zakażenia HIV. Szcze-

gólną uwagę zwrócono na ważną rolę metaloproteinaz macierzy (MMP - *matrix metalloproteinases*) i ich inhibitorów (TIMP - *tissue inhibitors of metalloproteinases*) w tym procesie oraz na możliwość ich zastosowania jako surowicznych markerów w ocenie postępu włóknienia. Dokonano przeglądu aktualnych możliwości diagnostycznych, których łączne wykorzystanie umożliwia pełniejszy wgląd w proces włóknienia wątroby w tej szczególnej grupie chorych.

PATOGENEZA WŁÓKNIENIA WĄTROBY W ZAKAŻENIU HCV

Włóknienie jest procesem obronnym uruchamianym jako mechanizm naprawczy wtórnie do zmian zapalno-uszkodzeniowych i prowadzącym do zastępowania uszkodzonych tkanek przez elementy tkanki łącznej. Włóknienie pojawia się w wielu chorobach przebiegających pierwotnie z uszkodzeniem mięszu wątroby, a w szczególności może stanowić niekorzystne zjawisko w ewolucji przewlekłych zapaleń wątroby wywołanych zakażeniami wirusami HBV i/lub HCV. Proces włóknienia postępuje, gdy dochodzi do zaburzenia równowagi między fibrogenezą a fibrolizą, co

może skutkować przebudową zrębu, a w konsekwencji daje zaburzenia naczyniowe i upośledzenie czynności wątroby klinicznie manifestujące się jako marskość.

Najważniejszym źródłem kolagenu w wątrobie są komórki Ito, częściej określane jako komórki gwiazdźdźiste (HSC – *hepatic stellate cells*). Istotną rolę odgrywają też miofibroblasty pochodzenia szpikowego, fibroblasty przestrzeni wrotnych, komórki endotelialne, komórki nabłonka dróg żółciowych i same hepatocyty. Uszkodzenie mięszu wątroby niezależnie od wywołującego je czynnika etiologicznego uruchamia mobilizację komórek nacieku zapalnego i aktywację komórek Kupffera, a wydzielane przez nie mediatory nasilają reakcję zapalną. W wyniku aktywacji przez liczne mediatory reakcji zapalnej, takie jak cytokiny, czynniki wzrostu, enzymy lizosomalne i hormony, komórki gwiazdźdźiste ulegają transformacji do miofibroblastów uzyskując właściwości prozapalne i fibrogenne. Najsilniejszym aktywatorem dla HSC jest PDGF wydzielany przez komórki Kupffera.

Wykazano, że niektóre białka rdzeniowe i niestrukturalne HCV (NS3 i NS5) poprzez receptory CD81, C1q i receptor dla LDL mogą bezpośrednio aktywować HSC (1). Ta bezpośrednia stymulacja HSC może tłumaczyć zjawisko progresji włóknienia zachodzącej często w przebiegu zakażenia HCV przy niewielkim nasileniu odczynu zapalnego. Pobudzone komórki gwiazdźdźiste migrują do miejsca uszkodzenia tkanek, gdzie w wyniku zarówno transkrypcyjnych, jak i potranskrypcyjnych mechanizmów regulacyjnych, dochodzi do zwiększonej produkcji i wydzielania kolagenu, przez co komórki te stają się głównym źródłem białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – *extracellular matrix*).

Macierz zewnątrzkomórkowa to przestrzeń, w której sieć wielu białek tworzy rusztowanie dla komórek. W skład ECM wchodzi trzy główne komponenty: kolageny (I, III, IV, V i VI), glikoproteiny (laminina, fibronektyna A, entaktyna, undulina, elastyna i fibrylina) oraz proteoglikany – siarczan heparanu. W zaawansowanym procesie włóknienia wątroby objętość ECM wzrasta ponad 10-krotnie, zmieniają się też proporcje poszczególnych składników. W postępującym włóknieniu i w marskości wątroby wzrasta ilość kolagenu typu I, często jest go dwukrotnie więcej niż kolagenu typu III.

Wydzielane w czasie reakcji zapalnej cytokiny silnie oddziałują na proces włóknienia w wątrobie. Stymulująco na fibrogenezę wpływają: *monocyte chemotactic protein type 1* i chemokiny RANTES, a hamująco IL-10 i IFN gamma. Najsilniej pobudzająco na fibrogenezę działają czynniki wzrostu takie jak TGF beta 1 (*transforming growth factor*) i PDGF (*platelet-derived growth factor*), które zwiększając aktywność komórek gwiazdźdźistych powodują zwiększenie syntezy białek macierzy ECM, równocześnie hamując degradację kolagenu. Ważną rolę odgrywają też cytokiny wazoaktywne, w tym

przede wszystkim angiotensyna II, silnie aktywująca HSC, działająca indukująco na proliferację i migrację komórek nacieku zapalnego, stymulująca sekrecję cytokin prozapalnych i fibrogenezę. Cytokiny wydzielane przez komórki nacieku zapalnego oraz wolne rodniki pobudzają HSC do produkcji kolagenu, a równocześnie pobudzone HSC wytwarzają chemokiny i cząsteczki adhezyjne oraz modulują aktywację limfocytów. W ten sposób powstaje błędne koło, w którym proces zapalny napędza włóknienie i odwrotnie. Pobudzenie procesu włóknienia zależy od szeregu czynników związanych z reakcją zapalną i w warunkach zachowanej homeostazy tkanek ma charakter naprawczo-obronny. W niektórych sytuacjach dochodzi jednak do nadmiernej akumulacji tkanki włóknistej zbudowanej głównie z kolagenu typu I nie tylko w wyniku zwiększonej syntezy, ale głównie upośledzonej degradacji. W procesie degradacji białek macierzy bardzo istotną rolę odgrywają metaloproteinazy macierzy, enzymy należące do rodziny zależnych od cynku endopeptydaz. Enzymy te wytwarzane są m.in. przez liczne komórki nacieku zapalnego, a także fibroblasty i komórki endotelialne łącznie z ich specyficznymi inhibitorami (TIMP – *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*), co zapewnia równowagę w utrzymaniu składu ECM (2). Obecnie znanych jest ponad 30 metaloproteinaz, zdolnych do degradacji większości składników macierzy pozakomórkowej i błony podstawnej, oraz 4 ich swoiste inhibitory. Wyróżnia się 6 głównych podgrup metaloproteinaz wydzielonych w oparciu o różnice w budowie i powinowactwo do różnych substratów. W wątrobie stwierdza się ekspresję MMP-1 (kolagenaza śródmięszkowa), MMP-2 (gelatynaza A), MMP-3 (stromelizyna-1), MMP-8 (kolagenaza neutrofilowa), MMP-9 (gelatynaza B), MMP-12, MMP-13, i MMP-14. Dla postępującej fibrogeny charakterystyczne jest nasilenie syntezy białek macierzy, przy równoczesnym zahamowaniu wydzielania i aktywności metaloproteinaz.

Rolę metaloproteinaz i ich inhibitorów w patogenezie włóknienia wątroby w przebiegu zakażenia HCV zbadano dość dokładnie (3, 4), natomiast u chorych ze współzakażeniem HIV/HCV ich udział nie został dotąd określony. Opublikowano dotychczas tylko kilka prac poświęconych temu zagadnieniu. *Mastroianni* i wsp. badali stężenia MMP-9 i TIMP-1 w surowicy krwi u 76 pacjentów HIV+, w tym u 27 ze współzakażeniem HIV/HCV. Wykazali znamienne wyższe stężenia TIMP 1 u chorych zakażonych HIV i HCV w stosunku do pacjentów HIV+/HCV-. Stwierdzili także, że wyższe wartości TIMP-1 występują u chorych z bardziej nasilonym deficytem immunologicznym, z liczbą CD4+ <300 kom/mm. (5) *Larrousse* i wsp. stwierdzili pozytywną korelację stężenia TIMP-1 (a także w mniejszym stopniu MMP-2) w surowicy krwi ze stopniem nasilenia włóknienia u 119 chorych zakażonych HIV/HCV (6).

CZYNNIKI PRZYŚPIESZAJĄCE WŁÓKNIENIE WE WSPÓŁZAKAŻENIU HIV/HCV

Tempo, w jakim dokonuje się postęp choroby w zakażeniu HCV, jest zróżnicowane u różnych chorych, a również u tego samego pacjenta proces włóknienia nie zawsze przebiega w sposób liniowy. Analiza czynników mających wpływ na progresję włóknienia wątroby była przedmiotem prac wielu autorów. Największe znaczenie mają badania *Poynarda* i wsp., którzy określili dynamikę włóknienia wprowadzając pojęcie wskaźnika postępu włóknienia - FPR – *fibrosis progression rate*). Definiując FPR jako stosunek stopnia włóknienia w skali METAVIR do szacunkowego czasu trwania zakażenia HCV autorzy wykazali, że w badanej grupie 1157 chorych FPR wynosił średnio 0,252/rok. Opierając się na tych wynikach stwierdzili, że czas trwania choroby do powstania marskości wątroby wynosi średnio 30 lat, u 33% chorych może rozwinąć się marskość w czasie krótszym niż 20 lat, a u 31% nie dojdzie do tego przed upływem 50 lat trwania zakażenia HCV. W tej samej pracy zbadano i określono wiele czynników, które przyspieszają proces włóknienia. Najważniejsze z nich to zdaniem autorów nadużywanie alkoholu, płeć męska i starszy wiek w chwili nabycia zakażenia (7). Inne znane obecnie czynniki to otyłość, cukrzyca, zwiększona zawartość żelaza w tkance wątrobowej oraz stopień aktywności martwiczo-zapalnej w wątrobie. Niejednoznaczny jest wpływ genotypu wirusa, w większości prac wykazano, że tempo progresji włóknienia nie zależy istotnie od genotypu, inne wykazują, że włóknienie postępuje szybciej w zakażeniu genotypem 3 HCV (8).

Badania ostatnich lat dotyczące współzakażenia HIV/HCV wykazały, że przy współistnieniu tych zakażeń proces włóknienia wątroby postępuje kilkakrotnie szybciej. Ma na to wpływ szereg zjawisk, między innymi bezpośredni wpływ wirusa HIV, pogłębiający się w przebiegu zakażenia deficyt immunologiczny, rekonstrukcja immunologiczna oraz hepatotoksyczność stosowanych leków antyretrowirusowych.

Wpływ zakażenia HIV

Wirus HIV nie wykazuje bezpośredniego działania hepatotropowego, nie namnaża się w hepatocytach i nie wywołuje zapalenia wątroby. Jednak badania nad rolą chemokin w procesie włóknienia wątroby doprowadziły do stwierdzenia, że komórki gwiaździste wykazują ekspresję różnych receptorów chemokin, m.in. także CCR5 i CXCR4, które jak wiadomo, odgrywają rolę koreceptorów dla HIV (9).

Ostatnio udowodniono, że białko gp 120 HIV może przez receptory chemokin CXCR4 i CCR5 bezpośrednio stymulować komórki gwiaździste, co wyraża

się zwiększoną chemotaksją oraz sekrecją TIMP-1 i IL-6. Wyniki tych badań po raz pierwszy wskazują na możliwy bezpośredni wpływ białek HIV na nasilenie fibrogenyzy. (10)

W patogenezie zakażenia HIV zasadniczą rolę odgrywa proces aktywacji immunologicznej. Badania Allisona i wsp. wykazały, że u pacjentów zakażonych HIV/HCV istnieje wyraźna korelacja między nasileniem aktywacji immunologicznej limfocytów T i B a pobudzeniem komórek gwiaździstych. W pracy tej wykazano ważną rolę IL-15 w procesie aktywacji komórek gwiaździstych (11).

Deficyt immunologiczny

Wiele prac wskazuje na to, że zaawansowanie włóknienia wątroby ściśle koreluje ze stopniem deficytu immunologicznego wyrażającego się spadkiem bezwzględnej liczby limfocytów CD4+. Wpływ liczby limfocytów CD4 oraz zjawiska rekonstrukcji immunologicznej na stopień zaawansowania włóknienia szczegółowo ocenia praca *Martinez- Sierra* i wsp. Autorzy ci wykazali jednoznacznie, że pacjenci z CD4 <200 kom/mm³ mają statystycznie istotnie bardziej zaawansowane włóknienie (p=0.01) (12). Zaś *Benhamou* i wsp. stwierdzili, że u pacjentów z CD4 <200 kom/mm³ szybszy był postęp włóknienia oceniany, jako stopień zaawansowania włóknienia, w stosunku do czasu trwania zakażenia HCV (13). W kolejnej pracy wskaźnik progresji włóknienia u chorych z współzakażeniem HIV/HCV miał wartość 0.17 stopnia/rok, a u osób HIV- 0,13 stopnia/rok (p=0,01), według skali Metavir, co pozwala przewidzieć, że rozwój marskości wątroby nastąpi odpowiednio po 23 i 32 latach. W tej samej pracy wykazano znamienne większe nasilenie włóknienia i zapalenia u chorych z liczbą CD4 < 250 kom/mm³ (14). Wpływ zaawansowania deficytu immunologicznego na postęp włóknienia potwierdza też praca *Sterling* i wsp. Autorzy ci porównali 66 chorych HIV/HCV z 119 pacjentami zakażonymi tylko HCV i nie znaleźli żadnych różnic między tymi grupami, jak również nie zidentyfikowali czynników, które w obu tych grupach mogłyby być związane z większym zaawansowaniem włóknienia. Autorzy tłumaczą ten fakt tym, że w badanej grupie zdecydowaną większość stanowili pacjenci sprawni immunologicznie (CD4 >200 kom/mm³) oraz duży był udział chorych z prawidłową aktywnością ALT. (15)

Immunosupresja rozwijająca się u nieleczonych chorych może powodować zmiany w wewnątrzwątrobowym profilu cytokin z przewagą prozapalnej i profibrogennej odpowiedzi Th2 zależnej. Badania na zwierzętach potwierdzają, że dominacja odpowiedzi Th2 wiąże się z nasileniem włóknienia. Ponadto u chorych zakażonych HIV/HCV wykazano istotnie niższe stężenia IL-10 produkowanej przez swoiste limfocyty

T CD4+ swoiste dla HCV w porównaniu do pacjentów zakażonych tylko HCV, a wiadomo, że IL-10 wywiera działanie przeciwzapalne (16). We współzakażeniu HIV/HCV stwierdza się także wybiórcze upośledzenie funkcji komórek dendrytycznych oraz zmniejszoną syntezę cytokin w odpowiedzi na stymulację antygenami HCV (17). Te zjawiska związane z postępującym deficytem immunologicznym w przebiegu zakażenia HIV tłumaczą szybszą progresję włóknienia i korelację zaawansowanego włóknienia z nasileniem immunosupresji.

Terapia antyretrowirusowa (HAART)

Kilkunastoletnie doświadczenia z prowadzeniem terapii antyretrowirusowej pozwalają stwierdzić, że HAART skutkująca zahamowaniem replikacji HIV i dająca w efekcie poprawę funkcjonowania układu immunologicznego korzystnie wpływa na obraz morfologiczny wątroby. Wiele prac potwierdza, że skuteczna HAART przyczynia się do hamowania progresji włóknienia, np. *Mehta* wykazał, że w trakcie skutecznego leczenia antyretrowirusowego obniża się wskaźnik martwiczko-zapalny (18). *Sulkowsky* natomiast stwierdził, że najważniejszym czynnikiem przyspieszającym postęp włóknienia jest wysoka wiremia HIV (HIV RNA > 10.000 kopii/ml) (19). *Brau* i wsp. stwierdzili wolniejszą progresję włóknienia u chorych skutecznie leczonych antyretrowirusowo (20).

Mechanizm, który sprawia, że w czasie stosowania skutecznej terapii antyretrowirusowej dochodzi do zahamowania progresji włóknienia, nie jest jasny.

Kilka niedawno opublikowanych wyników badań potwierdziło, że po zastosowaniu HAART obniża się wskaźnik martwiczko-zapalny w wątrobie, co w konsekwencji może spowalniać proces włóknienia. Jest to jednak zjawisko zaskakujące. W wyniku rekonstrukcji immunologicznej występującej po rozpoczęciu terapii antyretrowirusowej można by spodziewać się raczej nasilenia reakcji martwiczko-zapalnej, gdyż w zakażeniu HCV uszkodzenie hepatocytów następuje głównie na drodze immunologicznej przez specyficzne limfocyty CD4+, a nie przez bezpośredni cytotatyczny efekt działania HCV. Niektóre leki antyretrowirusowe niezależnie od hamowania replikacji HIV mogą także mieć bezpośredni wpływ na obniżenie stężeń profibrogennych cytokin, np TGF- β 1. W badaniu na myszach wykazano spadek stężenia TGF- β 1 po zastosowaniu sakwinawiru (21).

Zdecydowana większość prac podkreśla korzystny wpływ HAART na stan wątroby pacjentów zakażonych HIV, mimo że wieloletnie jej stosowanie zwiększa ryzyko wystąpienia hepatotoksyczności wszystkich grup leków. Toksyczność wątrobowa rozwija się 3-4 razy częściej u pacjentów ze współzakażeniem HIV/HCV. Pomimo częstego jej występowania w praktyce

klinicznej nie stwierdzono jednoznacznie, aby przekładało się to bezpośrednio na postęp włóknienia. Tylko w jednym doniesieniu wykazano niekorzystny wpływ długoletniego stosowania leków antyretrowirusowych na ryzyko zgonu z powodu niewydolności wątroby (22).

METODY OCENY WŁÓKNIENIA

Ocena histopatologiczna

Ocena zaawansowania włóknienia w wątrobie na podstawie badania histopatologicznego bioptatu pobranego w wyniku gruboigłowej biopsji narządu jest metodą stosowaną w praktyce klinicznej od ponad 50 lat. Mimo licznych niedogodności tej metody wciąż uznawana jest za „złoty standard” postępowania diagnostycznego. Biopsja wątroby jest badaniem inwazyjnym, obciążonym niewielkim ryzykiem powikłań. Zgony z powodu następstw tych powikłań występują w 1:1000 - 1:10000 przypadków. Badanie histopatologiczne dostarcza oceny statycznej, należy także liczyć się z tzw. błędem próby, wynikającym z niejednorodności zmian w obrębie narządu. Ocena histopatologiczna jest ponadto zawsze w dużym stopniu subiektywna, mimo wprowadzenia wielu punktowych skal mających służyć większej obiektywizacji.

W 1981 roku został sformułowany i opublikowany przez *Knodella* i wsp pierwszy system umożliwiający zobiektywizowaną, półilościową i powtarzalną ocenę zmian morfologicznych w przebiegu przewlekłych zapaleń wątroby, które wcześniej oceniano jedynie opisowo. System ten nazwany HAI (*histological activity index*) obejmuje trzy kategorie oceniające aktywność martwiczko-zapalną i jedną kategorię dla włóknienia, w każdej kategorii nasilenie zmian oceniane jest punktowo. Zmiana o 4 punkty w wynikach dwóch kolejnych biopsji jest uważana za istotną (23).

W latach 90-tych nastąpił ogromny postęp wiedzy w zakresie etiologii i diagnostyki molekularnej przewlekłych zapaleń wątroby, który sprawił, że przed patomorfologami pojawiły się nowe wyzwania. W 1991 *Scheuer* stwierdził, że konieczna jest modyfikacja terminologii i opracował nową skalę pierwotnie przeznaczoną dla oceny przw o etiologii wirusowej. Skala ta, zwana skalą *Scheuera*, jest znacznie prostsza od HAI. Aktywność martwiczko-zapalna oceniana jest dwóch kategoriach: aktywność zapalna w przestrzeniach wrotnych i blaszce granicznej oraz aktywność zapalna śródzrakikowo. Trzecią kategorią oceny stanowi nasilenie włóknienia, wszystkie zmiany oceniane są ilościowo w skali od 0 do 4 punktów. Wielu autorów uważa, że taki system oceny najlepiej przystaje do charakteru zmian morfologicznych spotykanych w przebiegu przw typu C. W 1994 roku pojawił się kolejny system oceny zmian morfologicznych sformułowany przez *Ishaka*, w którym rozdzielono

aktywność zapalną na wrotną, okołowrotną (martwicę kęsovą), martwicę ogniskową i martwicę przęsłową, zaś włóknienie ocenia się w kategoriach wrotne, przęsłowe oraz przęsłowe z wytwarzaniem guzków regeneracyjnych. Opracowana przez autorów francuskich skala METAVIR wyróżnia z kolei ocenę martwicy kęsowej i zrazikowej oraz osobno opisuje włóknienie (24).

Wiele z opisanych wyżej systemów oceny morfologicznej zmian w wątrobie powstających w wyniku przewlekłego zapalenia jest wykorzystywana w praktyce, do opisu pojedynczej biopsji często używa się kilku skal. Ponadto patomorfologowie w oparciu o indywidualne doświadczenia stosują też własne modyfikacje oceny punktowej. Mimo to żadna z tych skal pojedynczo, ani też wszystkie łącznie, nie opisują w pełni i jednoznacznie obrazu morfologicznego wątroby.

Ocena włóknienia opiera się na ciągłej skali punktowej – „staging” (0–4 w punktacji według Scheuera, 0–6 według Ishaka). Punktacja zależy bardziej od zmian jakościowych w obrazie włóknienia, niż ilościowych. Progresja w skali punktowej nie jest proporcjonalna do ilości odkładanej tkanki łącznej. W rzeczywistości istnieją niezwykle istotne z punktu widzenia kliniki stadia pośrednie zaawansowania włóknienia pomiędzy ustalonymi punktami, których powyższe skale nie opisują, a które wymagają od patologa opisowego komentarza. Ponadto badanie to nie różnicuje kolejnych stadiów zaawansowania marskości wątroby. Do tego celu służą skale oparte na objawach klinicznych (np. Child-Pugh, MELD). Prawdziwie ilościowe metody histopatologicznej oceny włóknienia, opierające się np. na ocenie zawartości hydroksyproliny w tkance wątrobowej lub na komputerowej analizie rozległości obszaru zajmowanego przez specjalnie barwioną tkankę włóknistą w badanym wycinku wątroby, są na wczesnym etapie badań, których rezultaty są sprzeczne (25).

W tak złożonym procesie, jak przewlekłe uszkodzenie wątroby w przebiegu współzakażenia HIV/HCV z udziałem innych licznych czynników hepatotoksycznych, szczególnie daje się odczuć brak pogłębionej oceny morfologicznej.

Surowicze markery włóknienia

Niedoskonałość oceny morfologicznej tkanki wątroby we współzakażeniu HIV/HCV rodzi potrzebę uzupełniania diagnostyki o inne metody. Trwają badania nad poszukiwaniem surowiczego markera lub zestawu markerów, które byłyby pomocne w ocenie zaawansowania włóknienia, służyłyby do monitorowania jego progresji oraz byłyby przydatne w ocenie skuteczności leczenia. Główną zaletą takiej nieinwazyjnej metody jest możliwość wielokrotnego wykonywania pomiarów, co pozwoliłoby na dynamiczną ocenę postępu lub regresji choroby.

Idealny wg *Schuppana* marker włóknienia wątroby powinien ilościowo charakteryzować proces fibroge-

nezy lub fibrolizy, być specyficzny dla wątroby, mieć określony czas półtrwania, znaną drogę eliminacji i łatwość oznaczania tanią, prostą i powtarzalną metodą (26). W wielu pracach oceniano przydatność różnych składników ECM, a także enzymów i ich inhibitorów oraz cytokin patogenetycznie związanych z procesem włóknienia wątroby jako bezpośrednich markerów włóknienia wątroby. Badano w tym aspekcie między innymi kolageny (PIIINP- N-końcowy propeptyd prokolagenu typu III oraz kolageny typu IV), kwas hialuronowy (HA), lamininę, TIMP-1, MMP-1 i 2, glikoproteinę YKL-40 oraz TGF-beta1. Żaden z tych parametrów nie okazał się w pełni idealnym markerem włóknienia, ale niektóre kombinacje oznaczeń mogą być przydatne w praktyce klinicznej jedynie do różnicowania mało i znacznie zaawansowanego włóknienia (27). Niestety, żaden z markerów lub ich zestawów nie może być pomocny w kwalifikacji do leczenia przyczynowego, gdzie konieczne jest dokładniejsze określenie początkowych stadiów włóknienia.

W wielu pracach starano się ustalić, czy występuje korelacja stopnia włóknienia wątroby z aktywnością MMP i TIMP oraz sprawdzić, czy aktywność ta zmienia się pod wpływem leczenia przyczynowego interferonem i rybawiryną. Ustalano także przydatność oznaczania stężeń surowiczych MMP i TIMP do monitorowania progresji włóknienia. *Larrousse* i wsp., w pracy, której celem było określenie najbardziej miarodajnego surowiczego wskaźnika włóknienia, najlepiej skorelowanego z obrazem histopatologicznym, stwierdzili wyraźną korelację stężeń TIMP-1 i HA (kwas hialuronowy) z obrazem morfologicznym wątroby, szczególnie w przypadkach zaawansowanego włóknienia (staging 2-4). Autorzy ci sugerują włączenie oznaczeń tych biomarkerów włóknienia do rutynowej praktyki w procedurze kwalifikacji do leczenia i do monitorowania progresji choroby alternatywnie do biopsji wątroby chorych zakażonych HIV/HCV (6).

Pewną wartość diagnostyczną mają także indeksy włóknienia wyliczane na podstawie wartości różnych rutynowo oznaczanych parametrów biochemicznych. I tak na przykład najczęściej stosowany Fibrotest obejmuje α 2-makroglobulinę, bilirubinę, haptoglobinę, γ -globulinę, apolipoproteinę-A1 i aktywność GGTP, indeks APRI uwzględnia – AST i liczbę płytek krwi a wskaźnik *Forns*a liczbę płytek krwi, wiek pacjenta, GGTP i stężenie cholesterolu. (28) *Kelleher* i wsp. w grupie 95 zakażonych HIV/HCV oceniali wartość indeksu SHASTA (kwas hialuronowy, AST i albumina) i stwierdzili, że jest porównywalna z Fibrotestem, a wyraźnie przewyższa indeks APRI (29). *Cacoub P* i wsp. porównywali wyniki biopsji wątroby z wartościami różnych indeksów włóknienia u 127 chorych ze współzakażeniem i wykazali najlepszą korelację opisów morfologicznych z wynikami Fibrotestu (30).

Mimo że stale przybywa danych świadczących o przydatności oznaczeń różnych surowiczych markerów włóknienia w praktyce klinicznej, jak dotąd w żadnych wytycznych nie sugeruje się zastąpienia nimi oceny morfologicznej bioptatu wątroby. Mogą być natomiast cennym uzupełnieniem w ocenie zaawansowania procesu chorobowego przed leczeniem oraz stanowić badanie uzupełniające w częstym monitorowaniu postępu bądź regresji choroby.

Metody obrazowe

W diagnostyce włóknienia wątroby przydatne mogą być także metody obrazowe, w tym ultrasonografia, elastometria i rezonans magnetyczny.

Badanie ultrasonograficzne jest pomocne w ocenie zaawansowanego włóknienia, w praktyce metoda ta umożliwia diagnostykę nadciśnienia wrotnego. Nie ma zastosowania w różnicowaniu mniej zaawansowanych stadiów choroby.

Elastometria jest od kilku lat coraz szerzej stosowaną metodą pomiaru sprężystości tkanki wątrobowej przy użyciu specjalnego aparatu - FibroScanu. Technologia pomiaru polega na wykorzystaniu różnicy w przechodzeniu przez tkanki o różnej sprężystości fali ultradźwiękowej o niskiej częstotliwości (50 MHz). Badaniu poddawany jest cylindryczny fragment mięszu wątroby o średnicy 1 cm i długości 2 cm, czyli ok. 100 razy większy od bioptatu, przez co zmniejsza się ryzyko błędu próby. Wyniki podawane są w kilopaskalach, wartości niższe od 6 kPa odpowiadają małemu zaawansowaniu włóknienia (F0 i F1), w zakresie 6-9 kPa mieszczą się obrazy F2 i F3, a wynik powyżej 14 kPa świadczy z wysokim prawdopodobieństwem o marskości. W metaanalizie 9 badań, w których stosowano FibroScan do rozpoznawania marskości wątroby wykazano zadowalającą czułość – 87% i swoistość - 91% tej metody. (31) Wg Moreno i in. pacjentów ze współzakażeniem HIV/HCV należy włączyć ocenę elastometryczną do rutynowej praktyki klinicznej jako badanie przesiewowe zalecane raz w roku. (32)

Ciągle udoskonalana w ostatnich latach technika rezonansu magnetycznego (MRI), w tym szczególnie dyfuzyjny rezonans magnetyczny, stanowi obiecującą metodę oceny włóknienia wątroby. Wykazano, że pacjenci zakażeni HCV, z zaawansowanym włóknieniem w obrazie dyfuzyjnego MRI uzyskują istotnie niższe wartości ADC (*apparent diffusion coefficient*) niż zdrowi ochotnicy i chorzy z łagodnym włóknieniem. (33)

PODSUMOWANIE

W przebiegu współzakażenia HIV/HCV proces włóknienia wątroby przy współdziałaniu licznych, pozawirusowych czynników hepatotoksycznych postępuje

kilkakrotnie szybciej niż u pacjentów zakażonych tylko HCV. Ocena zaawansowania procesu chorobowego powinna być zatem dokonywana częściej, sugeruje się wykonywanie biopsji wątroby co najmniej co trzy lata. Pozostająca wciąż złotym standardem postępowania biopsja wątroby nie zawsze spełnia oczekiwania klinicystów, gdyż jest metodą inwazyjną, a badanie morfologiczne bioptatu obarczone jest pewnym subiektywizmem i tzw. „błędem próby”. W ocenie włóknienia w większości obecnie stosowanych skal stosuje się system czteropunktowy, który nie oddaje w pełni subtelności zmian zachodzących w wątrobie, szczególnie u pacjentów ze współzakażeniem.

Opisane wyżej niedogodności biopsji wątroby skłaniają do zastosowania w praktyce klinicznej innych metod oceny włóknienia. Jednak jak dotąd, żaden bezpośredni ani pośredni marker surowiczy, ani zestaw tych markerów, nie zyskał pełnego uznania klinicystów. Ze względu na niedostateczną czułość i swoistość testy te mogą być pomocne tylko w różnicowaniu małego i znacznie zaawansowanego włóknienia.

Pewne nadzieje wiąże się z rozwojem technik obrazowych, w tym szczególnie z elastometrią z zastosowaniem FibroScanu. W Polsce metoda dostępna jest dotychczas zaledwie w dwóch ośrodkach, jej szersze wprowadzenie do praktyki klinicznej mogłoby przyczynić się do lepszej opieki nad pacjentami zakażonymi HCV, a szczególnie nad tymi ze współzakażeniem HIV.

PIŚMIENNICTWO

1. Arima N, Kao CY, Licht T, i in. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* 2001; 276:12675-12684
2. Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 29:43-54.
3. Leroy V, Monier F, Bottari S, i in. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitor TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:271-279.
4. Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, i in. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 34:239-247.
5. Mastroianni CM, Liuzzi GM, dEttorre G, i in. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients co-infected with HCV and HIV. *HIV Clin Trials* 2002; 3:310-315.
6. Larrousse M, Laguno M, Segarra M, i in. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *JAIDS* 2007; 46:304-311.
7. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C.

- The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349:825-832.
8. Barreiro P, Martin-Carbonero L, Nunez M, i in. Predictors of liver fibrosis in HIV-infected patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection: assessment using transient elastometry and the role of HCV genotype 3. *Clin Infect Dis* 2006; 1:1032-1039.
 9. Hong F, Tuyama A, Lee TF, i in. Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stroma cell-derived factor-1 alfa-mediated stellate cell activation. *Hepatology* 2009; 49:2055-2067
 10. Bruno R, Galstri S, Sacchi P, i in. Gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver fibrogenesis. *Gut* 2010; 59:513-520.
 11. Allison RD, Katsounas A, Koziol DE, i in. Association of interleukin-15-induced peripheral immune activation with hepatic stellate cell activation in persons coinfecting with hepatitis C virus and HIV. *J Infect Dis* 2009; 200:619-623.
 12. Martinez-Sierra C, Arizcorreta A, Diaz F, i in. Progression of chronic hepatitis C to liver fibrosis and cirrhosis in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2003; 36:491-498
 13. Benhamou Y, Bochet M, Di MV, i in. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The multivirc group. *Hepatology* 1999; 30:1054-1058.
 14. Mohsen AH, Easterbrook PJ, Taylor C, i in. Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients. *Gut* 2003; 52:1035-1040.
 15. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, i in. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006; 43:1317-1325.
 16. Graham CS, Curry M, He Q, i in. Comparison of HCV-specific intrahepatic CD4+ T cells in HIV/HCV versus HCV. *Hepatology* 2004; 40:125-132
 17. Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, i in. Selective impairment in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol* 2004; 172: 4907-4916.
 18. Mehta S, Thomas D, Torbenson T, i in. The effect of antiretroviral therapy on liver disease among adults with HIV and HCV coinfection. *Hepatology* 2005; 41:123-131.
 19. Sulkowski M, Mehta S, Torbenson D i in. Rapid fibrosis progression among HIV/hepatitis C virus-co-infected adults. *AIDS* 2007; 21; 2209-2216.
 20. Brau N, Salvatore M, Rios-Bedoya C, i in. Slower fibrosis progression in HIV/HCV-coinfecting patients with successful HIV suppression using antiretroviral therapy. *J Hepatol* 2006; 44:47-55.
 21. Pacifici R, Di Carlo S, Bacosi A, i in. Cytokine production in saquinavir treated mice. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19:243-248.
 22. Lundgren J, Mocroft A, Soriano V, i in. Is there evidence for an increase in the death rate from liver-related disease in patients with HIV? The EuroSIDA study. Program and abstracts of the 10th European AIDS Conference; Nov 17-20, 2005; Dublin, Ireland. Abstract PS7/2
 23. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, i in. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1:431-435.
 24. Brunt E. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell Histology Activity Index and beyond. *Hepatology* 2000; 31:241-246
 25. Gomes AT, Bastos CG, Afonso CL, i in. How variable are hydroxyproline determinations made in different samples of the same liver? *Clin Biochem* 2006; 39:1160-1163
 26. Schuppan D, Krebs A, Bauer M, i in. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death and Differentiation* 2003; 10:59-67.
 27. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, i in. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004; 127:1704-1713.
 28. Macias J, Giron-Gonzales JA, Gonzales-Serrano M, i in. Prediction of liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting patients by simple non-invasive indexes. *Gut* 2006; 55:409-414.
 29. Kelleher TB, Afdahl N. Assessment of liver fibrosis in co-infected patients. *J Hepatol* 2006; 46:126-131.
 30. Cacoub P, Carat F, Bedossa P, i in. Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers In HIV/HCV co-infected patients: the fibrovic study – ANRS HC02. *J Hepatol* 2008; 48:765-773.
 31. Talwalkar JA, Kurtz DM, Schoenleber SJ, i in. Ultrasound-based transient elastography for the detection of hepatic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:1214-1220.
 32. Moreno S, Garcia-Samaniego J, Moreno A, i in. Noninvasive diagnosis of liver fibrosis in patients with HIV infection and HCV/HBV co-infection. *J Viral Hepat* 2009; 16:249-258.
 33. Lewin M, Poujol-Robert A, Boelle PY, i in. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 46:658-665.

Otrzymano: 26.08.2010 r.

Zaakceptowano do druku: 15.09.2010 r.

Adres do korespondencji:

Dr n. med. Małgorzata Ingot

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Chorób Wątroby

i Nabytych Niedoborów Odpornościowych Akademii

Medycznej we Wrocławiu

ul. Koszarowa 5

51-149 Wrocław

tel/fax 71 325 52 42

e-mail: minglot@interia.pl