

Markery jaterní fibrózy

Schneiderka P.

OKB FN Olomouc

SOUHRN

V kritickém review na stránkách Clinica Chimica Acta se trojice autorů z Ústavu klinické chemie a patobiochemie Univerzitní nemocnice v německých Cáchách věnuje klinické a laboratorní problematice jaterní fibrózy [Gressner O. A., Weiskirchen R., Gressner A. M. *Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests*. Clinica Chimica Acta 381, 2007, p.107–113]. Článek má nesporný edukační charakter. Není však jen synopsí aktuálního stavu poznání příslušných markerů, ale také střízlivým hodnocením jejich diagnostického a prognostického potenciálu. Přinášíme zde obsáhlý výťah tohoto článku.
Klíčová slova: játra, fibróza, cirhóza, biochemické markery.

SUMMARY

Schneiderka P.: Markers of liver fibrosis

In the critical review three authors from University Hospital in Aachen, Germany, pursue the clinical and laboratory problems of liver fibrosis [Gressner O. A., Weiskirchen R., Gressner A. M. *Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests*. Clinica Chimica Acta, 2007, 381, p. 107–113]. Their article undoubtedly possesses an educational design. However, it is not only synopsis of the actual state of the art in the knowledge of respective markers, but also rational evaluation their diagnostic and prognostic potential. Herewith we bring an extensive digest of the article.

Key words: liver, fibrosis, cirrhosis, biochemical markers.

Úvod

Hlavními příčinami chronické hepatitidy vedoucí k destrukci parenchymu a jeho náhradě jizevnatou tkání, tj. k fibróze, jsou onemocnění hepatitidou B a C a alkoholová i nealkoholová steatohepatitida a steatóza. Vzácnější je etiologie autoimunitní, parazitární (schistosomiáza) a genetická (hemochromatóza, Wilsonova choroba, deficit alfa-1-antitrypsinu aj.).

Fibrózu charakterizuje ukládání mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix, ECM) v důsledku molekulární přestavby různých typů kolagenů, proteoglykanů, strukturálních glykoproteinů a kyseliny hyaluronové (hyaluronanu).

Depozita této hmoty v perisinusoidálních (Disseho) prostorách a neúplná tvorba subendoteliálních bazálních membrán nejen utlačují hepatocyty a brání průtoku krve, ale poškozují také biosyntetické a vylučovací jaterní funkce a funkce dalších orgánů a tkání (viz koagulační faktory, transportní proteiny, hormony, amoniak). Diagnostika, sledování a terapeutické monitorování fibrogenese má proto velký klinický význam.

Dodnes je diagnostickým „zlatým standardem“ jaterní biopsie s následným histologickým vyšetřením. Hodnocení se provádí podle různých skórovacích systémů (Knodell, Ishak, METAVIR, Scheuer, Desmet a další), kterými se vyjadřuje stupeň zánětlivých či nekrotických změn (grading) a rozsah fibrózy (staging). Tento způsob má kromě invazivnosti i mnohé další nedostatky (zdravotní komplikace až ohrožení života, chyba vzorkování, subjektivní hodnocení, nízká reprodukovatelnost výsledků – variační koeficient až 55 %).

Z těchto důvodů vyvstala potřeba hledat neinvazivní markery fibrogenese v séru nebo plazmě.

Existují dva zásadně odlišné přístupy vedoucí k rozdělení markerů na dvě třídy. Markery I. třídy jsou přímé sérové markery reflektující obrat mezibuněčné hmoty anebo fibrogenní změny jaterních buněk. Jsou to vesměs nákladné jednotlivé laboratorní testy založené na představách o fibrogenese.

Markery II. třídy jsou kompilátem nepřímých sérových markerů, kterými se hodnotí všeobecné funkční změny, spíše než metabolismus mezibuněčné hmoty anebo fibrogenní přeměny buňky. Jde o víceméně levné rutinní laboratorní (jaterní) testy nebo jejich panely.

Základy fibrogenese

Všeobecným podnětem k fibrogenese je nekróza nebo apoptóza jaterní buňky s následnou zánětlivou reakcí, která aktivuje sousedící hvězdčkové buňky (synonyma: Itovy buňky, stelátové buňky, vitamin A skladující buňky) v subendoteliálním prostoru. Těch je ve zdravých játrech pouze 4–6 na 100 hepatocytů, skladují však více než 80 % jaterních retinoidů. Po aktivaci ztrácejí schopnost skladovat vitamin A a mění se v myofibroblasty produkující a secernující veškeré součásti pojiva (kolageny, elastin, strukturální glykoproteiny, proteoglykany a kyselinu hyaluronovou).

Předpokládá se, že menším dílem přispívají ke vzniku jizevnaté tkáně také fibrocyty, které vycestovaly z kostní dřeně, portální fibroblasty a biliární epitelové buňky.

Myofibroblasty neprodukují jen součásti mezibuněčné hmoty, ale i profibrogenní cytokiny a enzymy. Ty regulují katabolismus kolagenů a dalších součástí mezibuněčné hmoty, jako jsou metaloproteinázy a jejich tkáňové inhibitory. Jsou tedy významné také pro fibrolýzu.

Proces aktivace hvězdicových buněk a jejich transdiferenciace v myofibroblasty je řízen buněčnou interakcí s Kupfferovými buňkami, hepatocyty, sinusoidovými endoteliemi, krevními destičkami, lymfocyty a žírnými buňkami; zprostředkován je parakrinně secerovanými růstovými faktory, chemokiny a reaktivními kyslíkovými radikály. Významnými peptidovými mediátory aktivace hvězdicových buněk jsou TGF-beta, PDGF, IGF-I, ET-1, MCP-1 a HGF.

Škodlivé efekty fibrogenese jsou zčásti způsobeny novotvorbou bazálních membrán v subendoteliálním Disseho prostoru. Membrány zabraňují obousměrnému po-

hybu metabolitů mezi hepatocyty a krví v sinusoidech, což poškozuje nejen biosyntetické funkce hepatocytů, ale také clearance cirkulujících makromolekul. Situace se dále komplikuje omezením průtoku krve sinusoidy kvůli perisinusoidální fibróze. Rostoucí hemodynamický odpor přispívá k portální hypertenzi a vzniku perihepatálních zkratů, což dále zvyšuje malnutrici hepatocytů a urychluje jejich metabolickou insuficienci a (hypoxickou) nekrózu.

Table 1. Class I markers of liver fibrosis

Marker	Sample			Method	Clinical application
	Serum	Urine	Biopsy		
Extracellular matrix enzymes					
Prolyhydroxylase	+	-	+	REA, RIA	(+)
Monoaminoxidase	+	-	(+)	Enzymatic	-
Lysyloxidase	+	-	+	RIA	-
Lysylhydroxylase	+	-	-	RIA	-
Galaktosylhydroxylsyl-glukosyltransferase	+	-	+	RIA	-
Collagenpeptidase	+	-	+	Enzymatic	-
N-acetyl-beta-D-glukosaminidase	+	+	+	Enzymatic	(+)
Collagen, fragments and split products					
Type I					
N-terminal propeptide (PINP)	+	-	+	ELISA	-
C-terminal propeptide (PICP)	+	-	+	RIA	-
Type III					
Intact procollagen	+	-	-		
N-terminal propeptide (PIIINP)					
Complete propeptide (Col 1-3)	+	-	-	RIA	++*)
Globular domain of propeptide (Col-1)	+	-	-	RIA	+
Type IV					
NC1-fragment [C-terminal] (PIVP)	+	+	-	ELISA, RIA	(+)
7S domain (7S collagen)	+	+	-	RIA	(+)
Glycoproteins, matrix metalloproteinase (MMP), inhibitors of MMP (TIMP)					
Laminin, P1-fragment	+	-	-	RIA, EIA	(+)
Undulin	+	-	-	EIA	-
Vitronectin	+	-	-	EIA	-
Tenascin	+	-	-	ELISA	-
YKL-40	+	-	+	RIA, ELISA	(+)
(pro) MMP-2	+	-	-	ELISA	(+)
TIMP-1, TIMP-2	+	-	-	ELISA	(+)
sICAM-1	+	-	-	ELISA	(+)
sVCAM-1	+	-	-	ELISA	(+)
Glykosaminoglycans					
Hyaluronic acid	+	-	-	RLA, ELISA	++**)

Notes:

) 78% sensitivity, 81% specificity

) 86% sensitivity, 88% specificity

sICAM-1 = soluble intracellular adhesive molecule, sCD54

sVCAM-1 = soluble vascular cell adhesive molecule, sCD106

REA = Radioenzyme assay, RLA = Radioligand assay

Markery fibrózy I. třídy (tab. 1)

Tyto markery jsou odvozeny z výše popsaných molekulárně patogenetických principů fibrogenese. Jde o součásti mezibuněčné hmoty, které jsou nadprodukovány aktivovanými hvězdicovými buňkami a mají prodlouženou clearance vlivem metabolické dysfunkce anebo hemodynamických změn v játrech, nebo jsou to zvýšeně exprimované mediátory fibrogenese, jako je TGF-beta.

Celkově vzato, omezeného klinického použití se dočkal pouze N-terminální propeptid prokolagenu III (PIIINP), i když ani tento marker není všeobecně akceptován. Je třeba zdůraznit, že není specifický pro játra, neboť jeho vyšší hodnoty jsou známy také při plicní fibróze, akromegalii, revmatoidních chorobách, chronické pankreatitidě, aj.

Podobně ani strukturální glykoproteiny (např. undulin, tenascin), biosyntetické a katabolické enzymy kolagenu (např. prolylhydroxyláza, metaloproteinázy matrix) a různé jiné složky mezibuněčné hmoty se neprojeví jako zcela přesvědčivé markery pro detekci, grading a staging fibrózy.

Uváděná diagnostická kritéria jsou omezená, často nespolehlivá a kontroverzní. Navíc některé z těchto sérových markerů neodrážejí stimulovaný obrat mezibuněčné hmoty, ale jsou až projevem buněčného poškození (nekrózy).

Jako relativně lepší marker I. třídy se v několika studiích cirhózy, způsobené nealkoholovou steatózou,

osvědčila kyselina hyaluronová (hyaluronan) s citlivostí 86–100 %, specificitou okolo 88 % a AUC 0,97.

Vzhledem k tomu, že negativní prediktivní hodnota hyaluronanu při cut-off 60 mikrogramů/l je podstatně vyšší než pozitivní prediktivní hodnota (98–100 % versus 61 %), je hlavním použitím tohoto markeru vyloučení fibrózy. Stimulovaná syntéza kyseliny hyaluronové hvězdicovými buňkami, její sekrece do sinusoidální krve a krátký poločas (2–9 min) jsou dobrými předpoklady, aby se stala platným markerem fibrózy.

Laminin se považuje za prediktor portální hypertenze, neboť za těchto podmínek jsou nalézány jeho významně zvýšené koncentrace v krvi.

Jako marker fibrózy byl navržen také TGF-beta, jehož plazmatické koncentrace jsou zvýšeny u jaterních chorob a jsou úměrné jejich závažnosti. Avšak významná korelace s aktivitami AST a ALT i fakt, že podstatné množství TGF-beta je uloženo v hepatocytech a snadno se z nich vyplavuje, naznačují, že se jedná spíše o marker nekrózy a pro fibrogenezi může mít jen nepřímý klinický význam.

Růstový faktor pojivové tkáně, CTGF (CCN2), který je modulatorem TGF-beta, bývá ve fibrotické jaterní tkáni silně exprimován. Jde o protein secernovaný jak hvězdicovými buňkami, tak hepatocyty, takže by jeho koncentrace v séru mohla být racionálním ukazatelem nastupující fibrózy. Některé poslední studie tento předpoklad potvrzují.

Table 2. Class II markers of liver fibrosis

Index, score	Parameters	Disease	Senzitivity [%]	Specificity [%]	Ref.
PGAA	Prothrombin time, GGT, apolipoprotein A1, alfa-2 macroglobulin	Alcohol	79	89	6
Bonacini	Ratio ALT/AST, INR, platelet count	HCV	46	98	7
Sheth	Ratio AST/ALT	HCV	53	100	8
Park		HCV	47	96	9
PGA	Prothrombin time, GGT, apolipoprotein A1	Mixed	91	81	10, 11
Fortunato	Fibronectin, prothrombin time, PCHE, ALT, Mn-SOD, beta-NAG	HCV		94	12
Fibrotest	Haptoglobin, alfa-2 macroglobulin, apolipoprotein A1, GGT, bilirubin	HCV, HBV	75	85	1
Pohl	Ratio AST/ALT, platelet count	HCV	41	99	13
Actitest	Fibrotest + ALT	HCV			2
Forns	Age, platelet count, GGT, cholesterol	HCV	94	51	14
WAI (APRI)	AST, ALP, platelet count	HCV	89	75	3
Rosenberg ELF-test	PIIINP, hyaluronic acid, TIMP-1	Mixed	90	41	4
Patel	Hyaluronic acid, TIMP-1, alfa-2-macroglobulin	HCV	77	73	15
Sud (fibrosis probability index, FPI)	Age, AST, cholesterol, insulin resistance (HOMA), past alcohol intake	HCV	96	44	16
Leroy	PIIINP, MMP-1	HCV	60	92	17
Fibrometer	Platelet count, prothrombin index, AST, alfa-2 macroglobulin, hyaluronic acid, urea, age	Mixed	81	84	18
Hepascore	Bilirubin, GGT, alfa-2 macroglobulin, hyaluronic acid, age, gender	HCV	63	89	5
Testa	Ratio platelet count /spleen diameter	HCV	78	79	19
FIB-4	Platelet count, AST, ALT, age	HCV, HIV	70	74	20

Markery fibrózy II. třídy (tab. 2)

Markery II. třídy jsou odvozeny od standardních laboratorních testů, nesouvisejí bezprostředně s patogenezí fibrózy, ale při fibróze a cirhóze se (také) mění. Byly vybírány tak, aby za použití různých statistických modelů a matematických algoritmů poskytovaly co nejlepší nástroj pro detekci, staging a grading fibrózy. Bylo navrženo mnoho různých kombinací parametrů (panelů) a biochemických skóre včetně ukazatelů nekrózy, jako jsou AST a ALT, koagulační testy, stanovení transportních proteinů, bilirubinu a další.

Často se bere v úvahu pokles počtu trombocytů, způsobený u cirhotiků sekvestrací trombocytů do zvětšené sleziny a sníženou syntézou trombopoietinu v metabolicky insuficientních játrech.

Nejčastěji používanými algoritmy jsou fibrotest a actitest, oba založené na haptoglobulinu, alfa-2-makroglobulinu, apolipoproteinu A1, GGT, bilirubinu a v případě actitestu ještě ALT. Častými jsou dále Wai-skóre (AST, ALP, trombocyty), ELF-test (TIMP-1, PIIINP, kyselina hyaluronová) a hepaskóre (bilirubin, GGT, kyselina hyaluronová, alfa-2-makroglobulin, věk a pohlaví).

Mezi nimi byl zvláště rozsáhle zkoumán fibrotest a doporučen jako alternativa biopsie pro stanovení závažnosti chronické hepatitidy C. Fibrotest se nedávno ukázal také jako dobrý prediktor komplikací a mortality po chronické hepatitidě C.

Porovnávací hodnocení těchto panelů však nepotvrdilo jejich klinickou prioritu před biopsií. V průměru bylo jako správné potvrzeno pouze 40 % výsledků a asi 50–70 % výsledků nepřesně hodnotilo závažnost fibrózy. Navržené multiparametrové postupy u markerů fibrózy II. třídy je proto třeba v klinické praxi přijímat opatrně. Navíc, hodnoty cut-off a popsané algoritmy jsou závislé na standardizaci měření daných analytů, čehož dosud není ve světovém měřítku dosaženo.

Závěr

Ačkoliv nutně potřebujeme neinvazivní a specifické markery jaterní fibrózy, nemáme dodnes k dispozici ani jednotlivý parametr, ani takovou jejich kombinaci, která by splňovala všechna kritéria nezbytná pro široké, efektivní a spolehlivé diagnostické použití. Biochemická vyšetření sérových nebo močových markerů nejsou dosud tak validní, aby nahradila jaterní biopsii.

Snahy aplikovat rostoucí poznání buněčných a molekulárních principů fibrogeneze do vývoje dokonalejších diagnostických nástrojů přesto pokračují, takže se můžeme brzo dočkat vzniku nových markerů.

Kandidáty na ně lze získat i podrobnějším rozbořením stávajících markerů. Příkladem jsou diference nízké- a vysokomolekulární frakce kyseliny hyaluronové, specifické imunoanalýzy centrálních proteinů proteoglykanů (biglykan, decorin), nebo detekce cirkulujících markerů aktivovaných hvězdicových buněk a myofibroblastů. V úvahu připadá také analýza proteomu nebo dokonce glykomu s hodnocením profilů

proteinů a N-glykanů typických pro daný stupeň a rozsah jaterní fibrózy.

Nicméně, největším problémem vývoje každého nového neinvazivního markeru zůstává omezená spolehlivost onoho „zlatého standardu“, tj. jaterní biopsie. K nahrazení biopsie by mohly přispět pokročilé zobrazovací metody (CT, MRI, ultrazvuk) a jaterní elastografie (Fibroscan).

Literatura

1. **Imbert-Bismut, F., Ratziu, V., Pieroni, L., Charlotte, F., Benhamou, Y., Poinard, T.** Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*, 2001, 357, p. 1069–1075.
2. **Poinard, T., McHutchison, J., Manns, M., Myers, R. P., Albrecht, J.** Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology*, 2003, 38, p. 481–492.
3. **Wai, C. T., Greenon, J. K., Fontana, R. J. et al.** A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2003, 38, p. 518–526.
4. **Rosenberg, W. M. C., Voelker, M., Thiel, R. et al.** Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology*, 2004, 127, p. 1704–1713.
5. **Adams, L. A., Bulsara, M., Rossi, E. et al.** Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin. Chem.*, 2005, 51, p. 1867–1873.
6. **Naveau, S., Poinard, T., Benattar, C., Bedossa, P., Chaput, J. C.** Alpha-2 macroglobulin and hepatic fibrosis. *Dig. Dis. Sci.*, 1994, V39, p. 2426–2432.
7. **Bonacini, M., Hadi, G., Govindarajan, S., Lindsay, K. L.** Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Gastroenterol.*, 1997, 92, p. 1302–1304.
8. **Sheth, S. G., Flamm, S. L., Gordon, F. D., Chopra, S.** AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Gastroenterol.*, 1998, 93, p. 44–48.
9. **Park, G. J. H., Lin, B. P. C., Ngu, M. C., Jones, D. B., Katelaris, P. H.** Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2000, 15, p. 386–390.
10. **Poinard, T., Aubert, A., Bedossa, P.** A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. *Gastroenterology*, 1991, 100, p. 1397–1402.
11. **Teare, J. P., Greenfield, S. M., Thompson, R. P. H. et al.** Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet*, 1993, 342, p. 895–898.
12. **Fortunato, G., Gastaldo, G., Oriani, G. et al.** Multivariate discriminant function based on six biochemical markers in blood can predict the cirrhotic evolution of chronic hepatitis. *Clin. Chem.*, 2001, 47, p. 1696–1700.
13. **Pohl, A., Behling, C., Oliver, D., Kilani, M., Monson, P., Hassanein, T.** Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Gastroenterol.*, 2001, 96, p. 3142–3146.

14. **Forns, X., Ampurdanes, S., Llovet, J. M. et al.** Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*, 2002, 36, p. 986–992.
15. **Patel, K., Gordon, S. C., Jacobson, I. et al.** Evaluation of a panel of noninvasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J. Hepatol.*, 2004, 41, p. 935–942.
16. **Sud, A., Hui, J. M., Farrell, G. C. et al.** Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology*, 2004, 39, p. 1239–1247.
17. **Leroy, V., Monier, F., Bottari, S. et al.** Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors 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, p. 271–279.
18. **Cales, P., Oberti, F., Michalak, S. et al.** A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology*, 2005, 42, p. 1373–1381.
19. **Testa, R., Testa, E., Giannini, E. et al.** Noninvasive ratio indexes to evaluate fibrosis staging in chronic hepatitis C: role of platelet count/spleen diameter ratio index. *J. Intern. Med.*, 2006, 260, p. 142–150.
20. **Sterling, R. K., Lissen, E., Clumeck, N. et al.** Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*, 2006, 43, p. 1317–1325.

Do redakce došlo 20. 9. 2007.

*Adresa pro korespondenci:
Doc. MUDr. Petr Schneiderka, CSc.
Oddělení klinické biochemie
Fakultní nemocnice Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: schneidp@fnol.cz*