

**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и
паразитологии» Роспотребнадзора¹
ГБУ РО Дирекция областной инфекционной больницы²**

**Комплексный подход в изучении
показателей функционального
состояния и морфологической
структуры эндотелия при
хроническом гепатите С**

¹М.н.с. лаборатории санитарной микробиологии водных объектов
и микробной экологии человека (СМВО и МЭЧ) Грушко И.П.

²Заместитель директора по медицинской части, д.м.н., доцент
Романова Е.Б.

9 сентября 2021 г.

Актуальность проблемы

НОВОСТИ

**ПРЕЗИДЕНТ ПРИЗВАЛ СОКРАТИТЬ
РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕПАТИТА С
В ТЕЧЕНИЕ ДЕСЯТИ ЛЕТ**

ГЕПАТИТ ABC

Актуальность проблемы



«Много молодых жизней уносит гепатит С. Здесь тоже необходимы решения, которые позволят в горизонте десятилетия свести к минимуму эту опасность для здоровья нации»,
– СКАЗАЛ ВЛАДИМИР ПУТИН, ВЫСТУПАЯ С ПОСЛАНИЕМ ФЕДЕРАЛЬНОМУ СОБРАНИЮ.

21 апреля Президент России Владимир Путин в своем ежегодном обращении с посланием Федеральному собранию отдельно выделил гепатит С и заявил о необходимости разработать решения, которые позволят в течение 10 лет свести к минимуму распространение в России гепатита С.

Актуальность проблемы

Напомним, что по поручению Президента РФ разработан «Единый план по достижению национальных целей развития Российской Федерации на период до 2024 года и на плановый период до 2030 года».

В [проекте документа](#) на 1 марта 2021 года в рамках национальной цели «Сохранение населения, здоровье и благополучие людей» указаны цели по снижению заболеваемости вирусным гепатитом С (ВГС): ожидается, что заболеваемость снизится с показателя 27,8 на 100 тысяч населения в 2021 году до 3,7 на 100 тысяч населения к 2030 году.

Актуальность проблемы

Уже 2 мая 2021 года Владимир Путин утвердил перечень поручений по реализации Послания Президента Российской Федерации Федеральному Собранию Российской Федерации от 21 апреля 2021 года.

В частности, в Пр-753, п. 9д указано: «Правительству Российской Федерации совместно с органами исполнительной власти субъектов Российской Федерации с учетом ранее данных поручений [...] обеспечить поэтапную реализацию в 2021–2030 годах мероприятий, направленных на борьбу с гепатитом С, минимизировав риски распространения данного заболевания. Доклад – до 1 июля 2021 г., далее – один раз в полгода».

Актуальность проблемы

Повсеместная широкая распространенность
заболевания.

«Новые» случаи

Недостаточная изученность
механизмов прогрессирования
HCV-инфекции

Трудности в выборе
терапевтических
стратегий

Неблагоприятные исходы-
цирроз печени и ГЦК

Актуальность проблемы

- Несмотря на достигнутые успехи в разработке эффективных схем противовирусной терапии, многие вопросы, касающиеся патогенеза и в частности, механизмов прогрессирования хронических форм HCV-инфекции, остаются недостаточно изученными.
- Наличие случаев дальнейшего прогрессирования фиброза в ткани печени и развития внепеченочных поражений после достижения устойчивого вирусологического ответа в результате терапии (криоглобинемический синдром, В-клеточная лимфома).
- Не вызывает сомнений, что одним из наименее изученных аспектов патогенеза ХГС является эндотелиальная дисфункция. Несмотря на то, что при ХГС эндотелий представляется собой первую линию контакта с возбудителем, данные литературы по этому вопросу довольно малочисленны и противоречивы.
- Для оценки функционального состояния эндотелия наиболее часто используют биохимические маркеры: оксид азота, эндотелин-1, антиген и активность циркулирующего фактора Виллебранда и др. Некоторые авторы предлагают в качестве маркера повреждения эндотелия использовать асимметричный диметиларгинин, роль которого в патогенезе ХГС пока остается недостаточно изученной.
- В настоящее время практически отсутствуют данные о взаимосвязи нарушений функционального состояния эндотелия с изменениями его ультраструктурной организации. Нет единого мнения о конкретных механизмах развития ЭД при ХГС, вариантах клинической интерпретации лабораторных показателей функционального состояния эндотелия.
- По мнению ряда авторов, дальнейшее углубленное изучение этой проблемы может стать основой для разработки способов коррекции эндотелиальной дисфункции у больных хроническим гепатитом С, что может позволить улучшить результаты лечения.

Цель исследования

На основе комплексного изучения показателей функционального состояния и морфологической структуры эндотелия определить их патогенетическое значение при хроническом гепатите С.

Задачи

- 1) Дать характеристику функционального состояния эндотелия у больных ХГС в зависимости от стадии заболевания и активности инфекционного процесса
- 2) Изучить корреляционные связи показателей функционального состояния эндотелия с морфологическими признаками поражения печени у больных ХГС на разных стадиях заболевания
- 3) Усовершенствовать способ оценки эндотелиальной дисфункции у больных ХГС

Материалы и методы исследования:

В исследованиях участвовали от 38 до 95 больных с хроническими формами HCV-инфекции (хронический гепатит С и циррозом печени, кл. А по Child-Pugh).

Критерии включения в исследование:

- 1) возраст от 18 до 45 лет;
- 2) наличие в крови суммарных antiHCV, выявленных не менее чем в двух независимых лабораториях;
- 3) положительный результат детекции РНК HCV в крови и/или гепатобиоптате больного;
- 4) отсутствие тяжелой сопутствующей соматической патологии, требующей постоянного медикаментозного лечения (в том числе заболеваний в основе которых лежит сосудистая патология – сахарный диабет, заболевания сердечнососудистой системы, в том числе те, в основе которых лежит атеросклероз);
- 5) отсутствие аутоиммунной патологии и онкологических заболеваний;
- 6) отрицательный анализ на наличие в организме вирусов гепатита В и ВИЧ-инфекции;
- 7) отказ от употребления инъекционных психотропных препаратов и алкоголя (для зависимых).

Методы исследования больных ХГС

Общеклинические

- физикальный осмотр,
- общий анализ крови,
- развернутый биохимический анализ крови, включая билирубин, АлАТ, АсАТ.

Скрининг
на ГЦК
(УЗИ,
альфафето-
протеин)

Морфологические методы:

- 1) световая микроскопия гепато-биоптатов;
- 2) электронная микроскопия эндотелия синусоидов

Специфическая лабораторная диагностика:

- 1) индикация маркеров НВV, НСV, HDV (ИФА);
- 2) ПЦР на наличие РНК НСV с определением генотипа и уровня виремии

Маркеры эндотелиальной дисфункции:

- 1) **активность фактора Виллебранда;**
- 2) **эндотелин-1**
- 3) **асимметричный диметиларгинин**
- 4) **интерлейкин-8?**

Морфологическое исследование структуры эндотелия синусоидов у больных ХГС

Результаты проведенных нами исследований позволили выявить наиболее характерные морфологические признаки нарушений структуры эндотелия синусоидов у больных ХГС:

- отек и набухание эндотелиоцитов;
- очаговая деструкция эндотелия;
- активация эндоцитоза с появлением аутофагических вакуолей и белковых включений в цитоплазме эндотелиоцитов;
- фиксация тромбоцитов к эндотелию.

По мере прогрессирования HCV-инфекции, особенно на стадиях тяжелого фиброза и цирроза печени, наступает грубая деформация эндотелия – от очаговой деструкции до субтотального его поражения с формированием перисинусоидаального фиброза.

Маркеры эндотелиальной дисфункции

- Эндотелин-1
- Асимметричный диметиларгинин
- Активность фактора Виллебранда

Маркеры эндотелиальной дисфункции

Маркер ЭД	Материалы и методы	Результаты исследования
Эндотелин-1	<p>Обследовано 47 пациентов (20 мужчин и 27 женщин), из них 30 – с ХГС и 17 больных ЦП. Средний возраст обследованных составил $31,2 \pm 6,7$ лет. Верификация диагноза осуществлялась на основании стандартных диагностических методов. Определение содержания Эт-1 в сыворотке крови проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов фирмы Biomedica Medizinprodukte GmbH Co KG (Австрия).</p>	<p>Установлено, что у больных ЦП регистрируются более низкие показатели Эт-1 в сравнении с группой больных ХГС (соответственно $0,64 \pm 0,2$ и $1,9 \pm 0,5$ фмоль/мл, $p > 0,001$). При этом, низкий уровень Эт-1 ассоциировался с более выраженными морфологическими изменениями в эндотелии синусоидов.</p>

Маркеры эндотелиальной дисфункции

Маркер ЭД	Материалы и методы	Результаты исследования
Асимметричный диметиларгинин	<p>Исследования проведены у 43 пациентов с хроническими формами HCV-инфекции (34 мужчин, 9 женщин). Средний возраст обследованных составил $39,1 \pm 1,1$ лет. Из числа обследованных нами больных у 34 (79,0%) имел место ХГС и у 9 (21%) – цирроз печени (ЦП). В зависимости от стадии фиброза пациенты распределились следующим образом: отсутствие фиброза (F0) зарегистрировано у 4 (9%) больных, слабый (F1) и умеренный (F2) – соответственно у 10 (23%) и 12 (28%), выраженный фиброз (F3) – у 8 (19%) обследованных. Из числа больных ЦП к классу А по Child-Pugh отнесены 8 (88,9%) из 9 пациентов. Концентрацию АДМА в крови определяли иммуноферментным методом. С этой целью использовали коммерческий набор реактивов ADMA ELISA Kit “Immundiagnostik” K7828 (Германия). За норму приняты результаты обследования 30 практически здоровых лиц.</p>	<p>Исследования показали, что нарушения ультраструктурной организации эндотелия синусоидов регистрируются у абсолютного большинства пациентов (93,0%) с хроническими формами HCV-инфекции. При этом, минимальные нарушения в виде отека-набухания эндотелиоцитов и их виллезная трансформация наблюдались либо при отсутствии фиброза вообще или же при слабо выраженном фиброзе в ткани печени. В дальнейшем, по мере прогрессирования печеночного фиброгенеза структура эндотелия претерпевает существенные изменения. Так, практически у всех пациентов с выраженным фиброзом и, особенно, ЦП выявляется деструкция эндотелия, которая может носить как очаговый, так и субтотальный характер. Причем в последнем случае она уже является одним из основных факторов риска быстрого развития серьезных микроциркуляторных нарушений и портальногипертензионного синдрома. Анализ данных, полученных при изучении уровня АДМА, позволил установить, что его концентрация в крови оказалась повышенной у 93% больных. При этом, у больных ХГС зарегистрировано многократное (почти в 10 раз) повышение среднего значения АДМА по сравнению с нормой (соответственно $7,1 \pm 1,44$ мкмоль/л и $0,85 \pm 0,55$ мкмоль/л, $p < 0,001$). Достаточно четкая связь прослеживалась между уровнем АДМА и выраженностью нарушений структуры эндотелия. Так, в группе пациентов, у которых выявлялась деструкция эндотелия синусоидов средний уровень АДМА достиг $12,02 \pm 4,8$ мкмоль/л, достоверно превысив аналогичный показатель в группе больных, не имевших признаков эндотелиальной деструкции ($3,08 \pm 0,3$ мкмоль/л, $p < 0,001$).</p>

Асимметричный диметиларгинин

Таким образом, у больных ХГС высокий уровень АДМА в крови ассоциируется с выраженными изменениями структуры эндотелия. Возможным объяснением этого факта является высокая «резервная» внутриклеточная концентрация АДМА в эндотелии, которая в 5-10 раз превышает его уровень в крови [4]. По-видимому, на ранних стадиях ХГС повышение его уровня в крови, сопровождающееся выраженным вазоконстрикторным эффектом за счет уменьшения образования NO, может иметь компенсаторно-приспособительный характер и направлено на ограничение транэндотелиального доступа для различных токсических субстанций. В то же время обусловленная высокой концентрацией АДМА длительная вазоконстрикция в поздние периоды заболевания (F3-4) является крайне неблагоприятным фактором в отношении возможного развития гепатorenального синдрома.

Маркеры эндотелиальной дисфункции

Маркер ЭД	Материалы и методы	Результаты исследования
Активность фактора Виллебранда	<p>Обследование проведено у 61 пациента с ХГС в возрасте от 19 до 45 лет. При этом, средний возраст обследованных составил $38,7 \pm 1,1$ лет. Преобладали мужчины – 67,2%. У всех пациентов был идентифицирован 1б генотип возбудителя. Активность vWF исследовали методом агглютинации с помощью набора реагентов по ТУ 9398-031-05595541-2010 на оптическом агрегометре.</p>	<p>Проведенные исследования показали, что средний уровень активности ФВ у больных ХГС с наличием деструктивных изменений в эндотелии оказался достоверно более высоким, чем у пациентов с отсутствием каких-либо морфологических признаков его повреждения (соответственно $335,4 \pm 15,4\%$ и $94,8 \pm 4,7\%$; $p < 0,001$).</p> <p>В ходе корреляционного анализа нами было выявлено наличие прямой корреляционной связи между показателями активности ФВ и наличием деструкции эндотелия синусоидов ($r=0,83$; $p < 0,001$). Это позволило прийти к выводу о том, что уровень активности ФВ четко отражает характер морфологических нарушений в эндотелии синусоидов. Анализ полученных результатов представлен в таблице.</p>

Взаимосвязь морфологических нарушений эндотелия синусоидов с показателями активности ФВ у больных ХГС

Морфологические признаки	Число больных	Распределение больных по уровню активности ФВ		
		50-150%	151-250%	>250%
Повышенная активность эндоцитоза (отек и набухание эндотелия, аутофагические вакуоли в эндотелиоцитах)	35	3(8,6%)	32 (91,4%)	0(0)
Деструкция эндотелия	15	0(0)	1(6,7%)	14(93,3%)
Отсутствие нарушений структуры эндотелия	26	24 (92,3%)	2(7,7%)	0(0)

По результатам исследования получен патент на изобретение № 2734683



Способ неинвазивной оценки нарушений структуры эндотелия синусоидов у больных хроническим гепатитом С отличается тем, что проводят количественное определение в крови активности фактора Виллебранда (ФВ) и при значениях его активности выше 250% констатируют наличие деструкции эндотелия синусоидов, при показателях активности ФВ в диапазоне 150-250% – повышенную активность эндоцитоза с наличием аутофагических вакуолей без признаков деструкции эндотелия, а при уровне ФВ ниже 150% – отсутствие нарушений структуры эндотелия синусоидов.

Заключение

С нашей точки зрения, дальнейшее углубленное изучение у больных ХГС особенностей функционирования эндотелия может стать весьма перспективным научным направлением и способствовать разработке на этой основе способов фармакологической коррекции ЭД и прогноза неблагоприятных исходов заболевания.

По результатам исследования опубликованы следующие материалы:

1. Грушко И.П., Романова Е.Б., Мамедова Н.И., Кошевко И.А. Характеристика функционального состояния эндотелия у больных хроническим гепатитом С. Сборник материалов межрегиональной конференции терапевтов Юга России «Коморбидность как проблема современной медицины» (21 октября 2016г.), Ростов-на-Дону, 2016.-С.42-43.
2. Грушко И.П., Романова Е.Б., Руднева С.В., Хаблиева Э.М. Клинико-патогенетическое значение эндотелиальной дисфункции у больных хроническим гепатитом С и циррозом печени. Материалы X Ежегодного Всерос. Конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы, М.,2018.- С.60-61.
3. Романова Е.Б. Твердохлебова Т.И., Грушко И.П., Гапон М.Н. Активность фактора Виллебранда как маркер деструкции эндотелия синусоидов у больных хроническим гепатитом С. Материалы XII Ежегодного Всерос. интернет-конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: диагностика, лечение, профилактика, М.,2020.- С.193-194.
4. Романова Е.Б., Грушко И.П., Твердохлебова Т.И., Гапон М.Н., Агафонова В.В. Способ неинвазивной оценки нарушений структуры эндотелия синусоидов у больных хроническим гепатитом С. Пат. Российская Федерация 2734683, МПК⁷ G01N 33/48, A61B 5/145. – № 2020105357 ; заявл. 04.02.2020 ; опубл. 21.10.2020, Бюлл. № 30.
5. Грушко И.П., Романова Е.Б., Твердохлебова Т.И., Гапон М.Н., Агафонова В.В. Роль асимметричного диметиларгинина в развитии структурных нарушений эндотелия синусоидов у больных хроническим гепатитом С. Сборник материалов III региональной междисциплинарной научной конференции молодых ученых «Актуальные вопросы инфектологии, паразитологии и экологии, РНД.,2020.- С.21-23.
6. Романова Е.Б., Грушко И.П., Гапон М.Н., Агафонова В.В. Комплексная оценка показателей функционального состояния эндотелия у больных хроническим гепатитом С и циррозом печени. Материалы XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы, М.,24-26 мая 2021. – С.138.

**Благодарю
за внимание !**