مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / بهار ۱۳۸۹ / دوره ۱۲ / شماره ۱ (پی در پی ۳۳) / صفحات ۴۸ تا ۵۵

تحقیقی

سنجش تغییرات سرمی لامینین در بیماران هپاتیت مزمن حین درمان

دکتر هادی پارسیان[۱]، دکتر محمد نوری*[۲]، دکتر محمدحسین صومی[۳]، دکتر علی رحیمی پور[۴]، دکتر دردی قوجق[۵]
دکتر رسول استخری[۶]، دکتر مهرداد کاشی فرد[۷]، دکتر کریم آقچه لی[۸]، دکتر گلنار مجیدی[۹]

۱- استادیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک ، دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۲- دانشیار گروه بیوشیمی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد. ۳- دانشیار گروه داخلی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد. ۴- استاد گروه بیوشیمی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۵- دانشیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک ، دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۶- استادیار گروه آسیب‌شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی (ره) تبریز. ۷- استادیار گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی بابل ، بیمارستان یحیی نژاد بابل. ۸- استادیار گروه داخلی ، دانشگاه علوم پزشکی گرگان ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان ، گنبد. ۹- پزشک عمومی ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد ، بیمارستان امام خمینی (ره) تبریز.

چکیده

زمینه و هدف : *در سال‌های اخیر یافتن روش‌های غیرتهاجمی به منظور جایگزینی برای روش تهاجمی بیوپسی کبد مورد توجه قرار گرفته است. سطوح افزایش یافته گلیکوپروتئین لامینین در برخی بیماری‌های کبدی همراه با فیبروز گزارش شده است. لذا این مطالعه به منظور یافتن cut off point لامینین برای پیش‌بینی وجود فیبروز، مشخص کردن ارزش تشخیصی و بررسی اثرات درمان روی سطح سرمی آن در بیماران هپاتیت مزمن انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه مورد شاهدی سطح سرمی لامینین در ٦٢ بیمار هپاتیت مزمن مراجعه کننده به مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تبریز طی سال‌های ۸۷-۱۳۸٦ قبل از درمان و در فواصل زمانی دو ، چهار و شش ماه پس از شروع درمان و ۲۰ فرد سالم توسط ELISA سنجیده شد و با نتایج حاصل از بیوپسی بیماران مقایسه گردید.*

یافته‌ها : *میانگین غلظت سرمی لامینین در بیماران (۹۱/۹±۲۰/۹ ng/ml) نسبت به گروه کنترل (٤٦/۲±۱۰/۲ ng/ml) بالاتر بود (P<۰/۰۵). سطح سرمی لامینین در تمام مراحل فیبروز کبدی به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود (P<۰/۰۵). انتخاب سطح سرمی ۵۲ng/ml برای لامینین، در تمایز وجود داشتن یا نداشتن فیبروز در بیماران نسبت به گروه کنترل، حساسیت (۹٦/۸ درصد) و ویژگی (۸۰درصد) خوبی را نشان داد. شش‌ماه پس از شروع درمان کاهشی در سطح سرمی لامینین مشاهده گردید؛ اما همچنان سطح سرمی لامینین نسبت به گروه کنترل بالاتر بود (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *نتایج این مطالعه نشان‌دهنده وجود همبستگی مثبت بین سطح سرمی لامینین و شدت فیبروز بود. لذا از سنجش سطح سرمی لامینین به عنوان شاخصی غیرتهاجمی برای بررسی وجود فیبروز می‌توان استفاده نمود.*

کلید واژه‌ها : هپاتیت مزمن ، فیبروز کبدی ، لامینین ، درمان

---

* نویسنده مسؤول : دکتر محمد نوری ، پست الکترونیکی : nourimd@yahoo.com
نشانی : تبریز ، خیابان دانشگاه ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، بیمارستان امام رضا (ع) ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد ، تلفن : ۵۵۶۰۶۲۷ (۰۴۱۱) ، نمابر : ۳۳۴۴۱۳۳
وصول مقاله : ۸۷/۹/۱۳ ، اصلاح نهایی : ۸۸/۲/۲۶ ، پذیرش مقاله : ۸۸/۴/۲۱

مقدمه

لامینین (LN) یکی از گلیکوپروتئین‌های اصلی غشاهای پایه است (۱) و در اعمال مختلفی مثل تمایز سلولی، اتصالات سلولی و حفظ و نگهداری اسکلت سلولی با اتصال به ترکیباتی نظیر کلاژن تیپIV و هپارین سولفات نقش دارد (۲). در کبد لامینین در اطراف عروق و مجاری صفراوی یافت می‌شود (۳). در این اندام لامینین فعالیت‌های درون سلولی مختلفی نظیر تمایز طبیعی مجاری صفراوی، بیان ژنتیکی mRNA آلبومین در هپاتوسیت‌ها و نوسازی سلول‌های هپاتوسیت را برعهده دارد (۴). به نظر می‌رسد که لامینین در سلول‌های هپاتوسیت و سینوزوئیدال کبدی ساخته می‌شود (۵). در میان انواع مختلف سلول‌های موجود در سینوزئیدها، سلول‌های Stellate یا Lipocyte، بیشترین مقدار لامینین را تولید می‌کنند. در مراحل مختلف ایجاد سیروز کبدی، رسوب لامینین و کلاژن در فضاهای تحت اندوتلیایی یا Diss's space اتفاق می‌افتد (۶).

به علت رابطه میان رسوب لامینین در بافت‌ها با فیبروز پیشرفته، پیشنهاد شده؛ سنجش سطح سرمی لامینین به عنوان متغیری غیرتهاجمی برای ارزیابی میزان فیبروز کبدی در بیماران دچار فیبروز کبدی به علت دریافت الکل و یا به علت وجود بیماری‌های هپاتیت ویرال می‌تواند به‌کار رود. در مطالعات جداگانه‌ای سنجش سطح سرمی لامینین همراه با متغیرهایی نظیر هیالورونان، بخش N ترمینال پروکلاژن تیپ III(PIIINP) و نسبت AST به ALT به عنوان متغیرهای غیرتهاجمی برای تشخیص فیبروز کبدی پیشرفته در بیماران هپاتیت C مزمن به کار رفته است (۱۰-۷). در مطالعه Ratziu (۱۱) پیشنهاد شد که تعیین غلظت سرمی لامینین به عنوان تستی حساس در بررسی میزان شدت فیبروز در بیماران دچار فیبروز می‌تواند به‌کار رود.

در حال حاضر بیوپسی کبدی روشی استاندارد برای بررسی بالینی شدت فیبروز در بیماران کبدی است. بیوپسی کبدی روشی تهاجمی است و ممکن است منجر به ایجاد عوارض نامطلوب نظیر درد در ۳۰-۲۰درصد بیماران، عوارض جدی در ۰/۵درصد از بیماران و حتی مرگ گردد. به علاوه مسایلی همچون هزینه انجام بیوپسی، عدم امکانات لازم برای انجام آن در همه مراکز، عدم امکان انجام بیوپسی‌های مکرر و احتمال اشتباه در نمونه‌گیری و حتی تفسیر، از سایر محدودیت‌های این روش است (۱۲). بنابراین یافتن عوامل جایگزین برای بیوپسی کبدی امری اجتناب‌ناپذیر است. این مطالعه به منظور سنجش تغییرات سرمی لامینین به عنوان پارامتر جایگزین بیوپسی کبدی در بیماران هپاتیت مزمن در حین درمان انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه مورد شاهدی ۶۲ بیمار (۳۵ مرد و ۲۷ زن) در سنین ۶۵-۱۵ سال با میانگین و انحراف معیار سنی ۱۱/۳±۳۵/۴ سال بررسی شدند. از میان این بیماران، ۳۵ نفر به هپاتیت مزمن B، ۱۴نفر به هپاتیت مزمن C و ۱۳ نفر به هپاتیت اتویمیون (AIH) مبتلا بودند. بیماران از میان مراجعین به مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تبریز طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ انتخاب شدند. شاخص‌های ورود به مطالعه برای بیماران دارای هپاتیت مزمن B و C عبارت بودند از : الف) مثبت بودن تست‌های HBs-Ag یا HCV-Ab ؛ ب) سطوح افزایش‌یافته آمینوترانسفرازها به مقدار بیش از ۱/۵ برابر حد طبیعی حداقل برای شش‌ماه.

بیماران AIH بر اساس پروتکل بین‌المللی تشخیص بیماران AIH تشخیص داده شدند (۱۳).

از همه بیماران نمونه بیوپسی کبدی اخذ گردید و درجه‌بندی شدت فیبروز در آنها براساس ایندکس فعالیت هیستولوژیکی (histological activity index) HAI انجام پذیرفت (۱۶-۱۴).

بیماران با سابقه خونریزی‌های دستگاه گوارش و بیماران با سایر دلایل بیماری مزمن کبدی (نظیر بیماری ویلسون، هموکروماتوز، کمبود آلفا -۱- آنتی‌تریپسین و بیماری‌های صفراوی)، افراد سوء استفاده کننده از داروها و دریافت‌کننده الکل و بیماران با پیوند کبدی، از مطالعه حذف شدند.

برای تعیین سطح سرمی لامینین در افراد طبیعی، از ۲۰ فرد سالم (۱۰ مرد و ۱۰ زن) با میانگین و انحراف معیار سنی ۱۴/۷±۴۲ سال، نمونه خونی اخذ گردید. این افراد سطوح طبیعی آمینوترانسفرازها و آلکالین فسفاتاز (ALP) داشتند و هیچ سابقه‌ای از خونریزی دستگاه گوارش، بیماری‌های مزمن

کبدی، مصرف الکل و دخانیات، سابقه خانوادگی هپاتیت و سایر بیماری‌های کبدی، سوء استفاده از داروها و یا پیوند کبدی نداشتند.

از همه بیماران رضایت‌نامه کتبی برای اخذ نمونه خونی و بیوپسی کبدی گرفته شد و به آنها اعلام گردید؛ اطلاعات حاصل برای مطالعات علمی مورد استفاده قرار خواهد گرفت. همچنین این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز مورد تایید قرار گرفت.

پس از انجام بیوپسی کبدی و آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی بیماران واجد شرایط ورود به مطالعه مشخص شدند و از آنان ۷سی‌سی خون به طور ناشتا گرفته شد. در فواصل منظم دو ماهه یعنی ماه‌های دوم، چهارم و ششم پس از شروع درمان، دوباره از بیماران نمونه خونی گرفته شد. نمونه‌های خونی اخذ شده؛ حداکثر تا یک ساعت پس از خونگیری سانتریفوژ (۲۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه) شد و سرم آنها جدا گردید. آزمون‌های استاندارد کبدی (LFT) (Liver Function Tests) و آزمون‌های سرولوژیک برای تشخیص هپاتیت روی بخشی از سرم توسط کیت‌های تجاری در دسترس انجام شد و نتایج آن ثبت گردید. آنزیم‌های ALT و AST به روش کلریمتریک با کیت زیست‌شیمی (تهران- ایران) وآنزیم ALP با استفاده از پارانیتروفنیل فسفات به عنوان سوبسترا و کیت زیست‌شیمی (تهران- ایران) و با استفاده از اسپکتروفتومتر Apel (PD303S,Japan) سنجش شدند. مارکرهای سرولوژیک هپاتیت با استفاده از یک ELISA Reader (Norahan Fajr,Iran) و کیت‌های زیر سنجش شدند:

مارکر AIH :

Anti LKM-1 (type 1 liver and kidney microsomes, Euroimmun kit, Germany)

مارکر هپاتیت B :

Antinuclear antibody (ANA, Biazymekit, Birmingham, UK)

hepatitis B surface antigen (HbsAg, Diakey, ELISA kit, Korea, Shinjin Medics Inc)

hepatitis B surface antibody (HbsAb, Diakey, ELISA kit, Korea, Shinjin Medics Inc)

hepatitis B core antibody (HbcAb; Dia-Pro ELISA, Italy)

مارکر هپاتیت C :

HCV antibody (HCVAb; Diakey, shinjin Medics Inc. ELISA kit, Korea)

باقی‌مانده سرم تا زمان آنالیز نهایی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های خونی اخذ شده از گروه کنترل هم مشابه روش فوق بررسی شد؛ با این تفاوت که از این گروه بیماران فقط یک نمونه خونی در ابتدای مطالعه اخذ گردید.

بیماران هپاتیت C تحت درمان دارویی Pegylated Interferon (۱۸۰ میکروگرم در هفته) و Ribaverin (برای افراد زیر ۷۵ کیلوگرم ۸۰۰ میلی‌گرم روزانه و بالای ۷۵ کیلوگرم ۱۲۰۰ میلی‌گرم روزانه) یا Interferon (سه میلیون واحد سه بار در هفته) و Ribaverin (برای افراد زیر ۷۵ کیلوگرم ۸۰۰ میلی‌گرم روزانه و بالای ۷۵ کیلوگرم ۱۲۰۰ میلی‌گرم روزانه) قرار گرفتند.

برای بیماران هپاتیت B داروهای Interferon (سه میلیون واحد سه بار در هفته) یا Adefovir (۱۰ میلی‌گرم روزانه) یا لامیودین (۱۰۰میلی‌گرم روزانه) تجویز شد.

رژیم دارویی استفاده شده برای بیماران AIH Prednisolone (۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و Imuran (۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم براساس وزن بدن) بود (۱۴).

سطح سرمی لامینین توسط یک ELISA Reader (Switzerland, Immunoscan, BDSL Lab System) و LN-EIA Kit (Takara Bio, code number : MK 107) سنجش شد. کیت LN-EIA براساس روش آنزیم اسی مدل ساندویچ است که در آن دو mouse monoclonal anti LN-Ab در پروسه دو مرحله‌ای برای سنجش لامینین به‌کار گرفته می‌شود. یکی از آنتی‌بادی‌ها به پلیت میکروتیتر باند می‌شود تا ایجاد یک Solid phase کند. با استفاده از بافرهای بلاک کننده، جلوی ایجاد اتصالات غیراختصاصی گرفته شد. نمونه‌های گروه بیماران، گروه کنترل و استاندارد در چاهک‌های پلیت انکوبه شدند. پس از شستشوی پلیت، anti-LN دوم که توسط پراکسیداز (POD) نشان‌دار داده شده بود؛ به پلیت‌ها اضافه شد و عمل انکوباسیون تکرار گردید. لامینین توسط Solid Phase از یک سو و POD-anti LN از سوی دیگر محاط شد. واکنش میان POD و سوبسترا (H2O2 و تترامتیل بنزیدین) منجر به ایجاد رنگ در پلیت گردید که شدت آن با میزان لامینین موجود در نمونه‌ها متناسب بود.

یک منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف استاندارد لامینین (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰و ۳۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در ستون افقی و میزان جذب نوری در محور عمودی، رسم گردید و مقدار لامینین در نمونه‌های گروه بیماران و کنترل با استفاده از این منحنی محاسبه گردید. تغییرات درون آزمون این روش کمتر از ۵ درصد بود.

برای تشخیص وجود فیبروز و بررسی شدت آن روی همه بیماران (۶۲ بیمار) در روز قبل از شروع درمان، بیوپسی کبدی انجام گرفت. نمونه‌های بافتی اخذ شده در محلول فرمالین ۱۰درصد به مدت ۱۲ ساعت فیکس شدند و سپس در پارافین قرار گرفتند. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط hematoxylin-eosin، Masson´s trichrome و reticulin رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت نمونه‌های بافتی آماده شده روی لام با توجه به Modified Knodell Score System برای بررسی درجه شدت فیبروز(Fibrosis Stage) و التهاب (Inflammation grade) بررسی شدند.

درجه‌بندی (Stage) شدت فیبروز بر اساس Modified Knodell Score System (۱۵ و۱۶) به شرح زیر انجام پذیرفت:

شدت صفر : در نمونه هیچ فیبروزی دیده نمی‌شود.

شدت یک : فیبروز تعداد محدودی از فضاهای Portal را درگیر کرده است.

شدت دو : فیبروز بخش نسبتاً زیادی از فضاهای Portal را درگیر کرده است.

شدت سه : فیبروز بخش زیادی از فضاهای Portal را درگیر کرده و portal to portal (P-P) Bridging رخ داده است.

شدت چهار : فیبروز بخش زیادی از فضاهای Portal را درگیر کرده و علاوه بر P-P Bridging ، portal to central (P-C) Bridging هم دیده می‌شود.

شدت پنج : P-C Bridging, P-P Bridging همراه با nodule دیده می‌شود.

شدت شش : سیروز کبدی وجود دارد.

داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS-12 آنالیز گردید و اختلافات در سطح آماری کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. اعداد به صورت میانگین و انحراف معیار نشان داده شدند. برای مقایسه میانگین سطح سرمی لامینین در بیماران با گروه کنترل از آزمون‌های آماری Man Whitney U-test و analysis of variance (ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین سطح سرمی لامینین در مراحل درمان (براساس شدت فیبروز) با سطح پایه (قبل از شروع درمان) از آزمون آماری ANOVA, post-hoc, least square differences (LSD) method استفاده شد. همچنین از ضریب همبستگی اسپیرمن برای ارزیابی شدت فیبروز در نمونه‌های بیوپسی کبدی با سطح سرمی لامینین استفاده گردید.

برای ارزیابی قدرت تشخیصی سطح سرمی لامینین برای تمایز وجود داشتن یا نداشتن فیبروز در بیماران از منحنی ROC استفاده شد (۱۷) و AUC (area under the curve) محاسبه گردید. منحنی ROC با استفاده از متغیرهای حساسیت در برابر ویژگی در Cut point های مختلف رسم گردید و بهترین Cut point انتخاب شد. اگر AUC مساوی یک باشد؛ بیانگر مناسب بودن تست برای تشخیص وجود بیماری است. در حالی که AUC کمتر از ۰/۵ نشان‌دهنده آن است که تست ارزش تشخیصی ندارد (۱۸).

یافته‌ها

افزایش سطح ALT (U/L ۱۴۱/۷±۱۳۲/۷ در گروه بیماران در قیاس با UL ۶/۴±۲۷/۳ در گروه کنترل)، AST (U/L ۱۳۸/۳±۹۷ در گروه بیماران در قیاس با U/L ۶/۵±۲۸/۳ در گروه کنترل) و ALP (U/L ۴۱۳/۷±۳۷۶/۴ در گروه بیماران در قیاس با U/L ۳۸±۱۳۰/۶ در گروه کنترل) در کلیه بیماران گزارش شد. این نتایج نشان داد؛ بیماران دارای اختلالات هپاتوسلولار بودند.

تست‌های سرولوژیک مشخص کردند که ۵۶/۴درصد از بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن B، ۲۲/۶درصد از بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن C و ۲۰/۹درصد از بیماران مبتلا به AIH می‌باشند. همچنین براساس نتایج آزمون‌های هیستولوژیکی ۳۵درصد بیماران فیبروز قابل توجه (شدت فیبروز بزرگ‌تر مساوی ۳) داشتند.

میانگین غلظت سرمی لامینین در گروه بیماران هپاتیت B،

جدول ۱ : مقایسه سطوح سرمی لامینین (میانگین±انحراف معیار ng/ml) در بیماران با شدت‌های مختلف فیبروز و مراحل مختلف نمونه‌گیری در قیاس با گروه کنترل (۱۰/۲ ng/ml ± ۴۶/۲)

سطوح لامینین در مراحل مختلف نمونه‌گیری	شدت فیبروز					
	صفر	۱	۲	۳	۴	۵
قبل از شروع درمان	۶۳/۰±۱۲/۱ **	۸۵/۷±۶/۳ ***	۹۴/۰±۱۰/۲ ***	۱۰۰/۶±۸/۶ ***	۱۰۴/۲±۲۰/۲ ***	۱۳۰/۲±۱۳/۷ ***
۲ماه پس از شروع درمان	۵۵/۴±۸/۵ **	۷۹/۵±۶/۶ ***	۹۰/۹±۱۲/۰ ***	۹۶/۰±۷/۰ ***	۱۰۰/۴±۱۸/۴ ***	۱۱۸/۲±۱۹/۰ ***
۴ماه پس از شروع درمان	۴۹/۲±۶/۰ *	۷۵/۳±۷/۰ ***	۸۵/۷±۱۲/۴ ***	۹۰/۰±۵/۰ ***	۹۳/۰±۱۵/۲ ***	۱۱۱/۷±۱۲/۶ ***
۶ماه پس از شروع درمان	۴۶/۲±۴/۵ *	۷۵/۲±۶/۰ ***	۸۳/۸±۱۱/۱ ***	۸۷/۶±۵/۹ ***	۸۸/۹±۱۳/۰ ***	۱۱۰/۲±۹/۵ ***

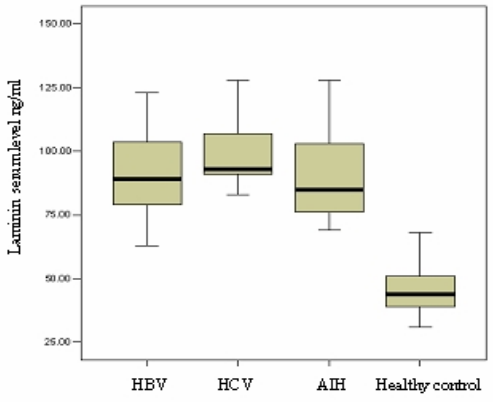
* اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ، ** P<۰/۰۵ ، *** P<۰/۰۰۱

جدول ۲ : منحنی ROC برای تمایز وجود داشتن یا نداشتن فیبروز در بیماران با فیبروز کبدی در قیاس با گروه کنترل قبل و شش ماه پس از شروع درمان (LN Cut off point = 52 ng/ml)

مراحل مختلف نمونه‌گیری	AUC (فاصله اطمینان ۹۵ درصد)	ارزش P	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	PPV (درصد)	NPV (درصد)
قبل از درمان	۰/۹۷۴ (۰/۹۴۵-۱/۰۰۴)	<۰/۰۰۱	۹۶/۸	۸۰	۹۳/۷	۸۸/۸
۶ماه پس از شروع درمان	۰/۹۲۶ (۰/۸۳۷-۰/۹۸۰)	<۰/۰۰۱	۸۳/۹	۸۰	۹۲/۸	۶۱/۵

AUC: area under the curve, PPV: positive value, NPV: negative predictive value

C و AIH در قیاس با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱) (شکل ۱).

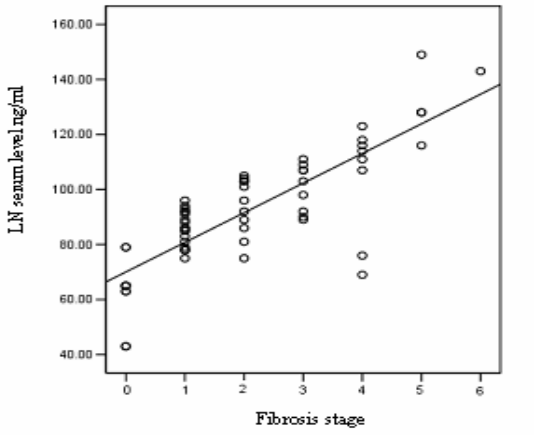


شکل ۱ : Box plot سطح سرمی لامینین (ng/ml) در بیماران با ویروس هپاتیت B (۲۰/۹ ± ۹۲ =HBV)، هپاتیت C (۲۴/۲±۹۲/۸ =HCV) ، هپاتیت اتوایمیون (۱۸/۴ ±۹۰/۶ =AIH) و گروه کنترل (Healthy control) در ابتدای مطالعه قبل از شروع درمان

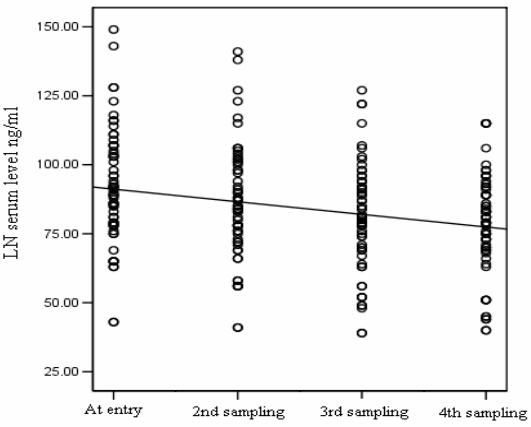
در جدول یک میانگین و انحراف معیار سطح سرمی لامینین در مراحل مختلف فیبروز و در مراحل مختلف نمونه‌گیری ارایه شده است. اختلاف در سطح سرمی لامینین تقریباً در همه مراحل مختلف فیبروز در قیاس با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) و تنها در نمونه‌گیری دفعات سوم و چهارم برای بیمارانی که شدت فیبروز در آنها صفر است؛ این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین در گروه بیماران با مرحله فیبروز شش، فقط یک بیمار وجود داشت. سطح سرمی لامینین در این بیمار ۱۴۳ ng/ml بود. از لحاظ آماری آنالیز این فرد تنها با گروه کنترل صورت نگرفت.

در بیماران دارای شدت فیبروز بالاتر، افزایش در سطح سرمی لامینین نسبت به نمونه‌گیری ابتدای مطالعه مشاهده شد (P<۰/۰۰۱ ، rS=۰/۷۸۸) (شکل ۲). پس از شروع درمان کاهش تدریجی در سطح سرمی لامینین مشاهده گردید. سطح سرمی لامینین شش ماه پس از شروع درمان با سطح سرمی لامینین در ابتدای مطالعه مقایسه شد. اگرچه کاهش تدریجی در سطح لامینین در بیمارانی با شدت فیبروز بالا (شدت فیبروز ۴و۵) قبل و پس از شروع درمان دیده شد؛ اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. برعکس در بیمارانی با شدت فیبروز پایین‌تر (شدت فیبروز صفر تا ۳) اختلاف در سطح سرمی

لامینین قبل و شش ماه پس از درمان از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱ برای شدت فیبروز صفر و یک) (P<۰/۰۵ برای شدت فیبروز ۲و۳).



شکل ۲ : همبستگی میان سطوح سرمی لامینین قبل از شروع درمان با شدت فیبروز. همبستگی میان این متغیرها با استفاده از ضریب همبستگی اسپیرمن محاسبه گردید (P<۰/۰۰۱ ، rS=۰/۷۸۸).



شکل ۳ : همبستگی میان سطح سرمی لامینین و مراحل مختلف نمونه‌گیری در حین درمان (P<۰/۰۰۱ ، rS=-۰/۲۳۵).

در شکل ۳ همبستگی میان سطح سرمی لامینین در مراحل مختلف نمونه‌گیری در حین درمان نشان داده شده است. کاهش تدریجی در سطح سرمی لامینین پس از شروع درمان وجود داشت (P<۰/۰۰۱ ، rS=-۰/۲۳۵).

در جدول ۲ Cut off point ، حساسیت و ویژگی تست لامینین برای تمایز وجود داشتن یا نداشتن فیبروز و همچنین اطلاعات منحنی ROC قبل از شروع درمان و شش ماه پس از شروع درمان نشان داده شده است.

بحث

در حال حاضر مارکرهای سرمی مختلفی برای بررسی پدیده فیبرینوژنز تحت بررسی است؛ تا شاید بتوان این مارکرهای غیرتهاجمی را به جای بیوپسی کبدی به‌کار برد. اما آنچه که مهم است این است که آیا این تست‌ها به قدر کافی قدرت تشخیصی برای اثبات وجود داشتن یا نداشتن فیبروز را دارند (۱۹)؟ و این که این مارکرها در حین درمان چه تغییراتی را نشان می‌دهند. در این مطالعه سطح سرمی لامینین در بیمارانی با هپاتیت مزمن مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص شود که آیا سنجش لامینین می‌تواند به عنوان عاملی در پیش‌بینی وجود فیبروز به‌کار رود؟ به علاوه به این امر توجه گردید که متعاقب درمان چه تغییراتی را برای سطح سرمی لامینین می‌توان پیش‌بینی کرد.

در مطالعه حاضر میانگین سطح سرمی لامینین در بیمارانی با هپاتیت مزمن در قیاس با گروه کنترل بالاتر بود. این امر توسط محققان دیگری هم نشان داده شده است (۸و۲۰).

با پیشرفت شدت فیبروز در این بیماران افزایش در سطح سرمی لامینین با شدت‌های مختلف فیبروز همبستگی مستقیم و مثبتی (rs=۰/۷۸۸) را نشان داد و می‌توان بیان داشت که دو متغیر رابطه خطی دارند (P<۰/۰۰۱). نتایج مطالعه اختلاف معنی‌داری را در سطح لامینین در مراحل مختلف نمونه‌گیری حین درمان در قیاس با گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۵). بررسی جدول یک نشان می‌دهد که پروسه درمان روی بیماران با شدت فیبروز کمتر، بیشترین تاثیر را دارد. زیرا کاهشی محسوس در سطح سرمی لامینین در مراحل پایین بیماری دیده شده است.

به نظر می‌رسد انتخاب نقطه (Cut point) ۵۲ ng/ml برای سطح سرمی لامینین، در تمایز میان وجود داشتن یا نداشتن فیبروز در این بیماران، نقطه مناسبی است. چون آنالیز آماری حساسیت ، ویژگی، PPV و NPV نتایج قابل قبولی را ارایه کرده‌اند. AUC از منحنی ROC، ۰/۹۷۴ به دست آمد که مفهوم آن این است که تعیین سطح سرمی لامینین در تمایز وجودداشتن یا نداشتن فیبروز، ایندکس مناسبی می‌تواند محسوب شود. با استفاده از نقطه ۵۲ ng/ml برای سطح سرمی لامینین، منحنی ROC برای بیماران شش ماه پس از درمان هم

رسم گردید که AUC به دست آمده قابل قبول است.

محققان مختلف نتایج مختلفی را در مطالعات خود گزارش کرده‌اند (۲۶-۲۰). Lebensztejn (۹) و Castera (۲۴) نشان دادند که سطح سرمی لامینین در مراحل ابتدایی بیماری کبدی افزایش می‌یابد و بالاترین مقدار سرمی لامینین را در بیمارانی با سیروز کبدی گزارش کردند. در مطالعه Santos (۲۱) سطوح سرمی لامینین با شدت فیبروز در بیماران در ارتباط بود و سطوح سرمی لامینین بالاتر از ۲۸۲ng/ml با بروز فیبروز در بیماران هپاتیت مزمن همراه بود. Xu (۲۲) نشان داد که سطوح سرمی لامینین بالاتر از ۱۲۲ng/ml با بروز فیبروز در بیماران هپاتیت مزمن همراه است و وجود داشتن و یا نداشتن فیبروز را می‌تواند نشان دهد. در مطالعه‌ای دیگر سطوح سرمی لامینین بالاتر از ۱۵۶ng/ml با بروز فیبروز در بیماران هپاتیت مزمن همراه بود (۲۳). با توجه به ماهیت بیماری و نوع مطالعات cut point های مختلفی گزارش شده؛ اما همه این مطالعات سطوح بالاتر سرمی لامینین را در بیماران دارای فیبروز کبدی گزارش کرده‌اند (۲۳-۲۱).

مکانیسم‌های مختلفی به عنوان علت افزایش سطح سرمی لامینین در بیماران دچار فیبروز کبدی ارائه گردیده است. به نظر می‌رسد در حین ایجاد فیبروز کبدی، هم افزایش تولید لامینین در کبد و هم کاهش در تجزیه لامینین توسط سلول‌های اندوتلیال کبدی رخ می‌دهد. Smedsord (۲۶) نشان داد که افزایش در رسوب بافتی و کاهش در توانایی تجزیه کبد برای این گلیکوپروتئین، منجر به افزایش قابل توجه سطح سرمی لامینین خواهد شد. در مطالعه‌ای که روی بیماران دچار بیماری کبدی ناشی از دریافت الکل انجام شد؛ سطح سرمی لامینین در ابتدای مطالعه (دوره دریافت الکل) بالا بود و به محض قطع مصرف الکل این سطح به حد طبیعی بازگشت (۲۷). در این مطالعه مشخص شد که با شروع درمان کاهش تدریجی در سطح سرمی لامینین دیده می‌شود. به‌نظر می‌رسد که پروسه درمان سبب نوسازی سلول‌های اندوتلیال کبدی می‌شود و سلول‌های اندوتلیال نوساز، قادرند این گلیکوپروتئین را بهتر تجزیه کنند. برای بررسی این وضعیت شاید نیاز به انجام مطالعات In vivo است تا بتوان اطلاعات بهتری از متابولیسم کبدی لامینین کسب نمود.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که همبستگی مستقیمی بین سطح سرمی لامینین و شدت فیبروز و التهاب در این بیماران وجود داشت؛ ارزیابی سطح سرمی لامینین به عنوان مارکر مفیدی در بررسی وجود داشتن یا نداشتن فیبروز کبدی می‌تواند به‌کار رود. باید خاطرنشان کرد که افزایش سطح سرمی لامینین در این بیماران دلالت بر کاهش فعالیت سلول‌های اندوتلیال دارد و می‌توان بیان نمود که سطح سرمی لامینین بالاتر از سطح predictive value احتمالاً با فیبروز کبدی در ارتباط است. همچنین با توجه به این که سطح سرمی لامینین در برخی بیماری‌ها مانند فیبروز شش‌ها افزایش می‌یابد؛ لذا لازم است که در استفاده بالینی از سطح سرمی لامینین در تشخیص فیبروز کبدی، ارزیابی‌های همه جانبه (انجام تست‌های روتین آزمایشگاهی، معاینات فیزیکی و بیوپسی کبدی) انجام پذیرد. ممکن است بتوان سنجش سطح سرمی لامینین را در بیمارانی که نمی‌توان برای آنها بیوپسی کبدی انجام داد؛ به‌کار برد. همچنین شاید بتوان با سنجش مکرر سطح سرمی لامینین، تعداد دفعات بیوپسی کبدی لازم برای بیمارانی که نیازمند انجام دفعات متعدد بیوپسی کبدی هستند را به حداقل رساند.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم امکان انجام بیوپسی دوم شش ماه پس از شروع درمان و تعداد نسبتاً کم نمونه‌های گروه شاهد اشاره نمود. بدیهی است؛ در صورتی که این محدودیت‌ها وجود نداشت؛ نتایج بهتری به دست می‌آمد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۸۵/۴-۷/۳) بود. از مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تبریز به خاطر حمایت مالی این تحقیق و نیز از تمامی بیماران محترمی که با اهدای خون و نمونه بیوپسی کبدی انجام این مطالعه را مقدور نمودند؛ قدردانی می‌گردد.

References

1. Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, et al. A new nomenclature for the laminins. Matrix Biol. 1994 Apr;14(3):209-211.

2. Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. J Anat. 1998 Jul;193 (Pt 1):1-21.

3. Kershenobich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. Ann Hepatol. 2003 Oct-Dec;2(4):159-163.

4. Caron JM. Induction of albumin gene transcription in hepatocytes by extracellular matrix proteins. Mol Cell Biol. 1990 Mar;10(3):1239-1243.

5. Mecham RP. Receptors for laminin on mammalian cells. FASEB J. 1991 Aug;5(11):2538-2546.

6. Martinez-Hernandez A, Delgado FM, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin. Lab Invest. 1991 Feb;64(2):157-166.

7. Li ZX, He Y, Wu J, Liang DM, Zhang BL, Yang H, et al. Noninvasive evaluation of hepatic fibrosis in children with infant hepatitis syndrome. World J Gastroenterol. 2006 Nov 28; 12(44):7155-7160.

8. Lydatakis H, Hager IP, Kostadelou E, Mpousmpoulas S, Pappas S, Diamantis I. Non-invasive markers to predict the liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int. 2006 Sep; 26(7):864-871.

9. Lebensztejn DM, Skiba E, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarski M. Serum hyaluronan and laminin level in children with chronic hepatitis B during long-term lamivudine treatment. Hepatogastroenterology. 2007 Apr-May;54(75):834-838.

10. Attallah AM, Toson EA, Shiha GE, Omran MM, Abdel-Aziz MM, El-Dosoky I. Evaluation of serum procollagen aminoterminal propeptide III, laminin, and hydroxyproline as predictors of severe fibrosis in patients with chronic hepatitis C. J Immunoassay Immunochem. 2007;28(3):199-211.

11. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. Gastroenterology. 2000 Jun;118(6):1117-1123.

12. Solís Herruzo JA. Current indications of liver biopsy. Rev Esp Enferm Dig. 2006 Feb;98(2):122-39.

13. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol. 1999 Nov;31(5):929-938.

14. Thomas CH, Lemon S, Zuckerman A. Viral Hepatitis. 3rd. USA, Massachusetts: Blackwell. 2005; pp:149-553.

15. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology. 1981 Sep-Oct;1(5):431-435.

16. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. J Hepatol. 1995 Jun;22(6):696-699.

17. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem. 1993 Apr;39(4):561-577.

18. Huguet J, Castiñeiras MJ, Fuentes-Arderiu X. Diagnostic accuracy evaluation using ROC curve analysis Scand J Clin Lab Invest. 1993 Nov;53(7):693-699.

19. Ponomarenko Y, Leo MA, Kroll W, Lieber CS. Effects of alcohol consumption on eight circulating markers of liver fibrosis. Alcohol Alcohol. 2002 May-Jun;37(3):252-255.

20. Sakugawa H, Nakayoshi T, Kobashigawa K, Yamashiro T, Maeshiro T, Miyagi S, et al. Clinical usefulness of biochemical markers of liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2005 Jan 14;11(2):255-259.

21. Santos VN, Leite-Mór MM, Kondo M, Martins JR, Nader H, Lanzoni VP, et al. Serum laminin, type IV collagen and hyaluronan as fibrosis markers in non-alcoholic fatty liver disease. Braz J Med Biol Res. 2005 May;38(5):747-753.

22. Xu GG, Luo CY, Wu SM, Wang CL. The relationship between staging of hepatic fibrosis and the levels of serum biochemistry. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2002 May;1(2):246-248.

23. Zheng M, Cai WM, Weng HL, Liu RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. World J Gastroenterol. 2002 Dec;8(6):1073-1076.

24. Castera L, Hartmann DJ, Chapel F, Guettier C, Mall F, Lons T, et al. Serum laminin and type IV collagen are accurate markers of histologically severe alcoholic hepatitis in patients with cirrhosis. J Hepatol. 2000 Mar;32(3):412-418.

25. Lebensztejn DM, Skiba E, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarski M. Serum hyaluronan and laminin level in children with chronic hepatitis B during long-term lamivudine treatment. Hepatogastroenterology. 2007 Apr-May;54(75):834-838.

26. Smedsrød B, Paulsson M, Johansson S. Uptake and degradation in vivo and in vitro of laminin and nidogen by rat liver cells. Biochem J. 1989 Jul 1;261(1):37-42.

27. Nouchi T, Worner TM, Sato S, Lieber CS. Serum procollagen type III N-terminal peptides and laminin P1 peptide in alcoholic liver disease. Alcohol Clin Exp Res. 1987 Jun;11(3):287-291.