

BIOCHEMICAL MARKERS OF FIBROGENESIS IN LIVER DISEASES

SZÁNTOVÁ M., KUPČOVÁ V.

BIOCHEMICKÉ MARKERY FIBROGENÉZY PRI PEČEŇOVÝCH OCHORENIACH

Abstract

Szantova M, Kupcova V:
Biochemical Markers of Fibrogenesis in Liver Diseases
 Bratisl Lek Listy 1999; 100 (1): 28–35

Chronic liver disease evaluation is a very complicated process requiring complex assessment of numerous liver functions. In addition to standard methods of investigation we perform biotransformation liver tests for evaluation of microsome enzyme system. Markers of fibrogenesis represent modern noninvasive tests for fibrotic liver process detection in different diseases. The key role in the process of fibrogenesis have the adipose liver cells (ITO cells) producing collagen I, III, IV and laminin. These cells may be transformed into myofibroblasts-like cells under specific conditions. Kupffer cells and monocytes produce substances stimulating the proliferation and transformation of liver ITO cells as also proteoglycans and hyaluronic acid synthesis. Mediators of this fibrogenetic activity are platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factors α and β , lymphokines and monokines released by T-lymphocytes and macrophages, interleukin 1- α and interferon- γ . Acetaldehyde and its metabolites are important stimulators of collagen production by liver fibroblasts. The most often used markers of hepatic fibrogenesis are the following: procollagen III peptide, procollagen IV. type (one of its end carboxypeptide chains is determined-either with 7s collagen or NC1), hyaluronic acid, fibronectin, tenascin and unduline. As the most sensitive markers of fibrinogenesis are considered: hyaluronic acid, laminine, procollagen IV. type. Less often used are enzymes participating in collagen synthesis: prolyl-4-hydroxylase, lysyl-hydroxylase, galactosyl-hydroxylysyl-glucosyl-transferase, monoaminoxidase and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. Breakdown of collagen is a multienzymatic process, catalysed by collagenases and other proteolytic enzymes. Decreased activity of collagenase is a supporting factor of cirrhosis development. Cirrhosis may be connected also with the levels of inhibitors such as e.g. serum/tissue? inhibitor of metalloproteinase. Biochemical markers of fibrogenesis are useful in regular monitoring of disease development and treatment effectiveness and should be an inseparable

Abstrakt

Szántová M., Kupčová V.:
 Biochemické markery fibrogenézy pri pečevných ochoreniach
 Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 1, s. 28–35

Posudzovanie chronického hepatálneho ochorenia je veľmi zložitá a vyžaduje komplexné ohodnotenie viacerých funkcií pečene. Popri štandardných vyšetrovacích metódach využívame určenie proteosyntetickej funkcie pečene a biotransformačné testy na posúdenie mikrozómového enzýmového systému. Markery fibrogenézy predstavujú moderné neinvazívne testy na zhodnotenie závažnosti fibrotického procesu v pečeni pri rôznych ochoreniach. Kľúčovú úlohu v procese fibrogenézy majú tukové bunky pečene (ITO cells), ktoré tvoria kolagén I, III, IV a laminín. Za určitých podmienok sa tieto bunky transformujú na bunky podobné myofibroblastom. Kupfferove bunky a monocyty produkujú látky, ktoré stimulujú proliferáciu a transformáciu pečevných ITO buniek, ako aj syntézu proteoglykánov a kyseliny hyalurónovej. Mediátormi tejto fibrogenetickej aktivity sú trombocytový rastový faktor (PDGF), transformujúce rastové faktory alfa a beta, ďalej lymfokíny a monokíny, uvoľňované T-lymfocyty a makrofágmi, interleukín 1-alfa a interferón gama. Acetaldehyd a jeho metabolity sú významným stimátorom produkcie kolagénu v pečevných fibroblastoch. Najčastejšie používané markery hepatálnej fibrogenézy sú: prokolagén III peptid, prokolagén IV. typu (určuje sa jeden z jeho koncových karboxypeptidových retazcov — buď 7s kolagén alebo NC1), kyselina hyalurónová, fibronektín, tenascín a undulín. Za najsenzitívnejšie markery fibrogenézy sa považujú kyselina hyalurónová, laminín, prokolagén IV. typu. Menej často sa používajú enzýmy zúčastňujúce sa na syntéze kolagénu: prolyl-4-hydroxyláza, lyzyl-hydroxyláza, galaktozyl-hydroxylyzyl-glukozyl-transferáza, monoaminoxidáza a N-acetyl-beta-D-glukozaminidáza. Odbúvanie kolagénu je multienzymový proces sprevádzaný kolagenázami a ďalšími proteolytickými enzýmami. Znížená aktivita kolagenázovej aktivity je podporným faktorom vývoja cirhózy a môže súvisieť s hladinami inhibitorov, akým je napr. sérový tkanivový inhibitor metaloproteinázy (Li, 1994). Biochemické markery fibrogenézy sú užitočné pri pravidelnom monitorovaní vývoja ochorenia a sledovaní efektu liečby a mali by byť neoddeliteľ-

The IIIrd Department of Internal Medicine, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava

Address for correspondence: M. Szántová, MD, III. interná klinika LFUK, Dérešova NsP, Limbová 5, 833 05 Bratislava, Slovakia.

III. interná klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave

le part of progression assessment in all chronic hepatopathies. (Fig. 3, Ref. 49.)

Key words: liver fibrosis, liver fibrogenesis, markers of fibrogenesis.

Rastúci trend v prevalencii a incidencii pečeňových ochorení v celosvetovom meradle a najmä etyltoxicky podmienených ochorení nevyvímajúc Slovensko (Szántová, 1997) vedie k hľadaniu nových neinvazívnych diagnostických metód a postupov. Neinvazívne metódy sú metódou prvej voľby v diagnostickom algoritme každého ochorenia, teda aj hepatálneho. Od 60. rokov sa zdokonaľujú a vyvíjajú stále modernejšie metódy umožňujúce posúdenie proteosyntetickej funkcie pečene (albumín, faktory protrombinového komplexu, prealbumín, cholinesteráza, transferín) (Kupčová, 1987, 1989, 1996). Uvedené ukazovatele sa líšia svojím biologickým polčasom a sú odrazom hepatálnej lézie. Parametre s kratším biologickým polčasom (cholinesteráza, transferín, prealbumín) sú citlivejším ukazovateľom aktuálnej funkcie pečene ako parametre s dlhším biologickým polčasom (Turecký, 1985, 1988; Kupčová, 1996). Paleta neinvazívnych diagnostických postupov v hepatológii sa rozšírila o testy biotransformačnej funkcie pečene. Tieto testy nás informujú o funkčnej kapacite mikrozómového enzýmového systému pečene. Na posúdení funkčnej kapacity pečene používame rôzne modelové látky (napr. antipyrín, teofylín, aminopyrín, kofeín, galaktóza, lidokaín a ďalšie) (Kupčová, 1990, 1994, 1996). Indikátory funkcie biotransformačného enzýmového systému pečene sa považujú vo svete za jeden z významných prognostických ukazovateľov pri dispenzárnom sledovaní a často sú súčasťou predtransplantačných vyšetrení (Kupčová, 1996).

Veľmi aktuálnou problematikou 80. a 90. rokov v neinvazívnej biochemickej diagnostike a prognóze pečeňových ochorení sú markery fibrogenézy. Biochemické markery fibrózy pečene majú snahu ohodnotiť stupeň fibrózy parenchýmu pečene na podklade jednoduchého krvného testu. Jednoduchosťou realizácie predstavujú pre pacienta značnú výhodu v porovnaní s invazívnym morfológickým vyšetrením pečene. Fibróza pečene je kľúčový moment, od ktorého sa odvíja nielen patologickeoanatomická definícia a klasifikácia ochorenia, ale aj modifikácia liečebných postupov. Stupeň fibrózy predstavuje významný prognostický marker chronických hepatálnych ochorení. Väčšina hepatálnych ochorení rozličnej etiológie je spojená s patobiochemickou reakciou označovanou pojmom fibróza a tomu zodpovedajúcim patologickeoanatomickým mikroskopickým obrazom. Označujeme tým nadmerné ukladanie spojivového väziva. Ide o aktívny proces, v ktorom tvorbu spojivového tkaniva stimulujú mezenchýmové aj parenchýmové pečeňové bunky. Z klinického pohľadu ukladanie kolagénu do perivenózných štruktúr môže byť najvčasnejšou manifestáciou procesu, ktorý v konečnom dôsledku vyústi do cirhózy. Fibrogenéza a fibrinolýza sú dva protikladné procesy, ktoré sú za fyziologických pomerov v rovnováhe, pri chronických ochoreniach pečene pôsobením rôznych vonkajších faktorov však môže dôjsť ku rôznemu stupňu akcelerácie procesu fibrogenézy. Priebežné vyšetrenie biochemických markerov fibrogenézy v dynamike môže poukázať na stacionárny, progredujúci, i regredujúci vývoj ochorenia. Je dôležité, že takto možno zdokumentovať aj antifibrotický vplyv liečebných postupov na priebeh ochorenia.

nou súčasťou hodnotenia progresie všetkých chronických hepatopatií. (Obr. 3, lit. 49.)

Kľúčové slová: fibróza pečene, fibrogenéza pečene, markery fibrogenézy.

Historický pohľad na fibrózu pečene

Začiatkom 50. rokov Hartroft predpokladal, že hlavným faktorom v rozvoji fibrózy je kolaps preexistujúcej hepatálnej strómy. Začiatkom 60. rokov Hans Popper predpokladal, že najvýznamnejšou úlohou vo fibrogenéze je proliferácia fibroblastov s tvorbou nového kolagénu. Roku 1965 Richard Stenger z Clevelandu potvrdil tento predpoklad štúdiami s použitím elektrónového mikroskopu. Detegoval novovytvorené vlákna fibrínu v Disseho priestoroch na modeli experimentálne indukovanej hepatálnej fibrózy (Meyer zum Buschenfelde, 1992). Ďalším dôležitým krokom bolo určenie novej populácie buniek, tzv. perisínusoidových pečeňových buniek (Wake, 1980).

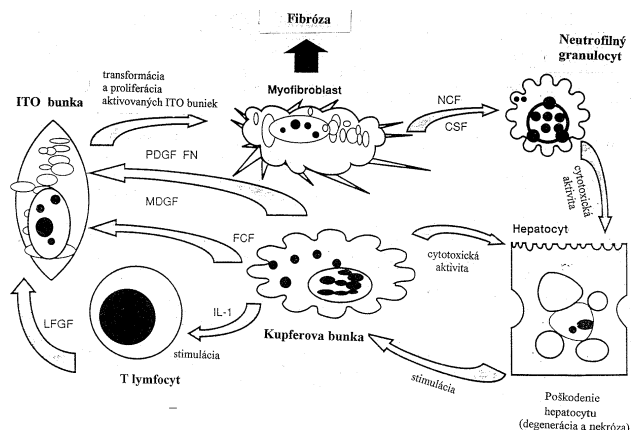
Súčasný pohľad na patofyziológiu fibrózy pečene

Za fyziologických okolností obsahuje pečeňové tkanivo 5–8 mg kolagénu na gram hmotnosti. Typické bielkoviny spojivového tkaniva (kolagény, štruktúrne glykoproteíny a preteoglykány) sa nenachádzajú len v cievnej stene, perivaskulárne a v kapsule, ale v malom množstve aj v parenchýme, najmä v Disseho priestoroch pozdĺž stien sínusoidov.

Jedinečná povaha hepatálnej extracelulárnej matrix je daná špecifickým zložením Disseho priestorov. Kým iné epitelové orgány majú dve bazálne membrány a extracelulárna matrix je interponovaná medzi endotelové a epitelové bunky, pečeňové lalôčky nemajú bazálnu membránu a sú obkolesené extracelulárnou matrix, ktorá pozostáva predovšetkým z fibronektínu, kolagénu I. typu a v menšom množstve je zastúpený kolagén III., IV., V. a VI. typu (Martinez, 1993). Táto konfigurácia spolu s fenestráciami a otvormi sínusoidových buniek predstavuje ideálny priestor pre rýchlu obojstrannú výmenu makromolekúl medzi plazmou a hepatocytmi.

Zdá sa, že spomedzi stálych buniek v zdravej pečeni syntetizujú kolagén hepatocyty, sínusoidové endotelové bunky a pečeňové tukové bunky (ITO cells, fat storage cells, stellate cells). Tukové bunky pečene tvoria kolagén I, III, IV a tiež laminín. Za určitých podmienok sa tieto bunky transformujú na bunky podobné myofibroblastom (Bachem, 1979). Dokázalo sa, že sekrety produkované aktivovanými Kupfferovými bunkami a monocytmi stimulujú proliferáciu a transformáciu ITO buniek, ako aj syntézu proteoglykánov a kyseliny hyalurónovej. Mediátormi tejto fibrogenetickej aktivity sú trombocytový rastový faktor (PDGF) a transformujúce rastové faktory alfa a beta. Ďalšími stimulátormi fibrogenézy sú interleukín-1 α , ktorý je najsilnejším stimulátorom kolagénu produkovaného fibroblastmi, a interferón gama. Aj ďalšie lymfokíny a monokíny tvorené T-lymfocytmi a makrofágmi majú úlohu v tvorbe kolagénu.

Acetaldehyd a iné metabolity oxidácie etanolu výrazne stimulujú produkciu kolagénu v pečeňových fibroblastoch. Patogézu alkoholom indukovanej fibrózy — s účasťou jednotlivých buniek a mediátorov znázorňuje obrázok 1 (Schuppan, 1988). Fibrogenéza je teda dôsledkom poškodenia hepatocytov. Na tomto



Obr. 1. Cytokinmi sprostredkovaná interakcia medzi leukocytmi, neparenchýmovými bunkami a parenchýmovými bunkami pečene v patogenéze alkoholom indukovanej fibrózy. ITO bb. – bunky zhromažďujúce tuk, PDGF – trombocytový rastový faktor, FN – fibronektín, MDGF – makrofágový rastový faktor, FCF – fibroblasty chemoatraktívny faktor, IL-1 – interleukín 1, NCF – neutrofilný chemoatraktívny faktor, CSF – kolónie stimulujúci faktor, LFGF – od lymfocytov odvodený fibroblastový rastový faktor (podľa Schuppana, 1988).

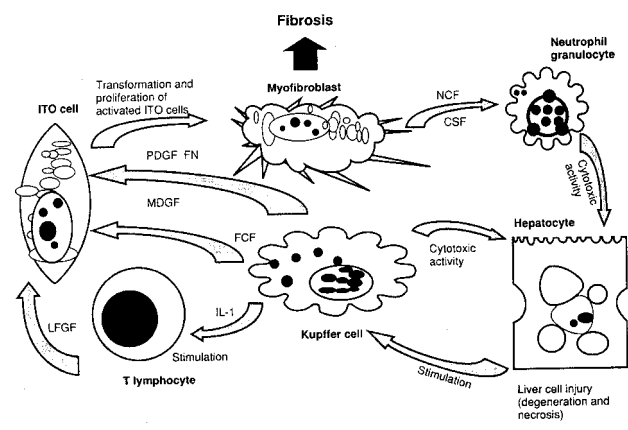
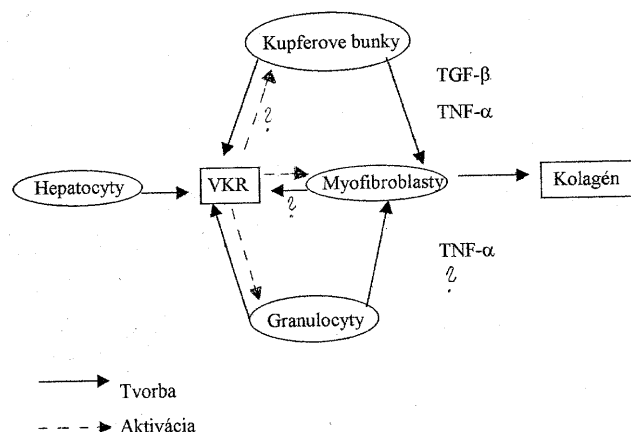


Fig. 1. Cytokine-mediated interactions between white blood cells, non-parenchymatous and parenchymatous liver cells in the pathogenesis of alcohol-induced fibrosis. ITO cell – fat storing cell, PDGF – platelet-derived growth factor, FN – fibronectin, MDGF – macrophage-derived growth factor, FCF – fibroblast-chemoattractant factor, IL-1 – interleukin 1, NCF – neutrophil-chemoattractant factor, CSF – colony stimulating factor, LFGF – lymphocyte-derived fibroblast growth factor.



Obr. 2. Aktivácia myofibroblastov, Kupfferových buniek a granulocytov voľnými kyslíkovými radikálmi a ich účasť na fibrogenéze pečene (podľa De Groota, 1992). TGF – transformujúci rastový faktor, TNF – tumor nekrotizujúci faktor, VKR – voľné kyslíkové radikály.

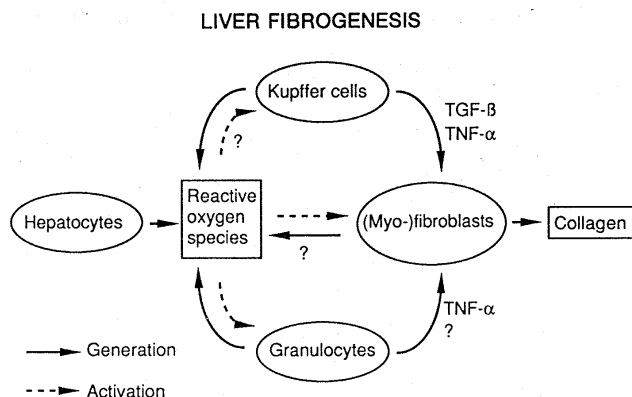
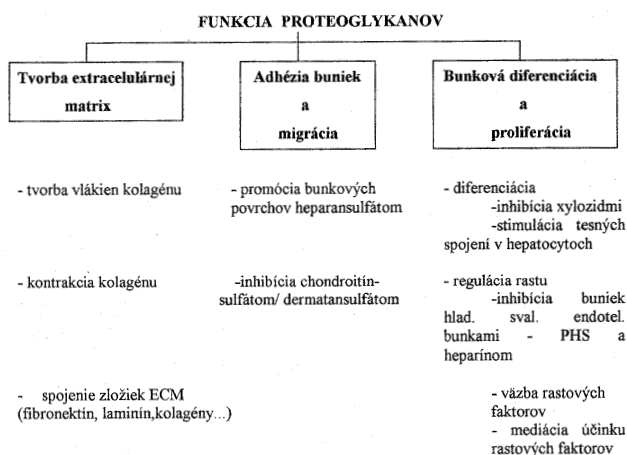


Fig. 2. Activation of myofibroblasts, Kupffer cells and granulocytes by reactive oxygen radicals and its possible involvement in fibrogenesis of the liver. TNF alpha – tumor necrosis factor, TGF beta – transforming growth factor.

procesu sa zúčastňujú parenchýmové, ako aj neparenchýmové bunky pečene. Nekróza hepatocytov vedie k aktivácii Kupfferových buniek a imigrácii makrofágov. Neutrofilny prirahované chemotaxiou zvyšujú poškodenie hepatocytov. Aj T-lymfocyty sa zúčastňujú na tomto dejí a stimulujú cytokíny, napr. interleukín 1. Fibroblasty sú aktivované bunkami ITO a transformujú sa na myofibroblasty (Scholmerich, 1990). Tieto bunky zodpovedajú za zvýšenú syntézu kolagénu a ďalších zložiek extracelulárnej matrix, hypersekreciu tenascinínu a vytváranie nodulov, s ktorými sa stretávame pri fibróze a cirhóze pečene (Schuppan, 1988; Tsukamoto, 1992; Lisssoos, 1992). Dôležitú úlohu majú biochemické reak-

cie, ktoré indukujú nahromadenie cytoskeletových proteínov (napr. aktín, tubulín, vimentín, cytokeratín a ďalšie) potrebných pre morfológickú transformáciu hepatocytov. Predmetom intenzívneho štúdia mnohých autorov je účasť voľných kyslíkových radikálov na procese fibrogenézy. Obrázok 2 znázorňuje možný mechanizmus aktivácie myofibroblastov, Kupfferových buniek a granulocytov voľnými kyslíkovými radikálmi. Fibróza pečene je dynamický proces. To znamená, že existujú rôzne stupne progresie, ale aj regresie fibrózy pečene u pacientov s chronickým hepatálnym ochorením. Regresia fibrózy sa dokázala jednak v experimentálnych štúdiách, ale aj u ľudí.



Obr. 3. Funkcia proteoglykánov v tkanivách a bunkách (podľa Gressnera, 1992). ECM – extracelulárna matrix, bb. hlad. sval. – bunky hladkej svaloviny, endotel. bunky – endotelové bunky, PHS – proteoheparansulfát.

FUNCTIONS OF PROTEOGLYCANS (PG)

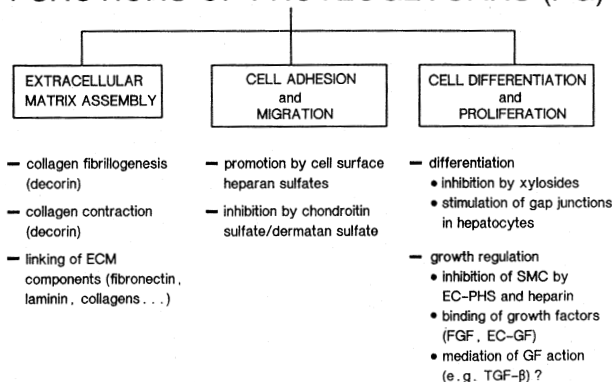


Fig. 3. Compartment-related functions of proteoglycans in tissues and cells. PHS – proteoheparan sulphate, EC – endothelial cells, GF – growth factors, SMC – smooth muscle cells, ECM – extracellular matrix.

Kolagén

Kolagén (odvodený z gréckeho slova v preklade tvorí glej) predstavuje heterogénnu skupinu extracelulárnych proteínov (Rauterberg, 1981) charakterizovaných jednotným zložením aminokyselín (asi 30 % glycinu, 20 % prolínu+hydroxyprolínu a rôzne množstvo hydroxylyzínu). Obsah glycinu v molekulách kolagénu je nezvyčajne vysoký pre bielkoviny — kolagén obsahuje dve aminokyseliny, ktoré sa vyskytujú veľmi zriedkavo v iných bielkovinách, a to 4-hydroxyprolín a 5-hydroxylyzín. Následnosť aminokyselín v kolagéne je pozoruhodne pravidelná — takmer každú tretiu tvorí glycín. Veľmi často sa vyskytuje aj sekvencia glycín-prolín-hydroxyprolín.

Kolagén rozdeľujeme do dvoch podskupín podľa miesta lokalizácie kolagénu. Ak sú kolagénové vlákna zastúpené v extracelulárnom priestore, označujeme ho pojmom intersticiálny typ kolagénu (tu patrí kolagén I, II, III). Druhý typ kolagénu označujeme pojmom kolagén bazálnych membrán. Pri fibróze pečene zisťujeme vzostup všetkých typov kolagénu, aj keď je v prevahe zvýšená produkcia kolagénu III. typu (Rauterberg, 1981).

Glykoproteíny

Glykoproteíny predstavujú stabilnú zložku extracelulárnej matrix spojivového tkaniva. Ide o heterogénnu skupinu z hľadiska chemického zloženia aj fyziologických funkcií. V poslednom čase sa zdôrazňuje úloha dvoch špecifických glykoproteínov: fibronektínu a laminínu. Funkcia fibronektínu súvisí s jeho väzbou na početné a rozdielne biologické štruktúry napr. kolagén, heparín, fibrín a zložky povrchu buniek. Laminín je hlavnou nekolagénovou štruktúrnou zložkou bazálnych membrán. Dokáže prilpieť epitelové bunky ku spojivovému tkanivu. Má vysokú afinitu ku kolagénu IV. typu.

Tenascín je oligomerný glykoproteín extracelulárnej matrix, ktorý sa fyziologicky syntetizuje v období embryonálneho vývo-

ja. V zdravej pečeni sa nachádza pozdĺž steny sinusoidov a cievnej steny. Pri fibróze pečene bol detegovaný aj medzi pečevým parenchýmom a portálnymi traktmi v mieste fibrózných premostení a tzv. „piecemeal“ nekróz. Vychádzajúc z imunoelektrónovomikroskopických štúdií pečevého tkaniva sa predpokladá, že tenascín sa syntetizuje v bunkách ITO, odkiaľ sa vylučuje do Disseho priestorov (Hirota, 1992).

Proteoglykány

Spojivové tkanivo pečene je bohaté na proteoglykány, ktoré pozostávajú z polysacharidov (asi 95 %) a bielkovín (asi 5 %). Tieto obrovské polyanióny viažu vodu a katióny a tvoria extracelulárne médium spojivového tkaniva. Patrí sem kyselina hyalurónová, chondroitínsulfát, keratansulfát, heparansulfát a heparín. Dermatansulfát a chondroitínsulfát sa častejšie vyskytujú pri fibróze pečene ako v zdravej pečeni. Funkcie proteoglykánov na procese fibrogenézy znázorňuje obrázok 3.

Enzýmy syntézy a odbúravania kolagénu

Syntéza kolagénu zahŕňa početné reakcie, ktoré sú katalyzované špecifickými enzýmami: prolýl-4-hydroxylázou, prolýl-3-hydroxylázou, lyzyl-hydroxylázou, galaktozylhydroxylyzylglukozyl-transferázou a prokolagén-galaktozyltransferázou. Ďalšie enzýmy katalyzujú premenu prokolagénu na kolagén. Kolagenázy prispievajú k degradácii kolagénu.

Biochemické markery pečenej fibrózy

Prokolagény

Kolagén III. typu je predominantným kolagénom pri fibróze pečene a len pri pokročilej cirhóze je predominantným kolagén I. typu (Murata, 1984). Rádioimunologické (RIA) štúdie dokazujú,

že kompletná molekula prokolagén-III-peptidu (P-III-P) sa vylučuje žľou. Degradovaný produkt prokolagén-peptidu — kolagén I sa vylučuje močom (Raedesch, 1982).

Hladiny prokolagén-III-peptidu sa líšia u zdravých osôb v závislosti od rastu — najvyššie hodnoty sa zistili v období rýchleho rastu a najnižšie hodnoty v dospelom veku sa zistili v neskorej adolescencii po ukončení rastu. V detskom veku hladiny P-III-P v sére nekorelujú so stupňom fibrózy aktívneho pečeneového ochorenia (Plebani, 1991). Dospelí s pečeneovým ochorením majú signifikantne vyššie hladiny P-III-P.

Zvýšené hladiny P-III-P sa pozorovali u pacientov s akútnou vírusovou hepatitídou a vzostup koreloval so stupňom aktivity aminotransferáz podľa údajov niektorých autorov (Annoni, 1988). Iní autori nepozorovali vzťah medzi týmito parametrami, ale zistili zvýšenú hladinu P-III-P pri každom akútnom ochorení s následnou normalizáciou do 6 mesiacov v prípade nekomplikovanej hepatitídy. V ďalšom sledovaní pacientov, u ktorých nedošlo k normalizácii hladín P-III-P, pretrvávali signifikantne vyššie hladiny u tých, u ktorých sa rozvinulo chronické ochorenie pečene na rozdiel od pacientov s nekomplikovaným priebehom (Change, 1989). Prvé práce zaoberajúce sa hladinami P-III-P u pacientov s chronickým hepatálnym ochorením priniesli sľubné výsledky, najmä pri chronickej aktívnej hepatitíde (Diodati, 1990). Perzistujúca elevácia P-III-P v sére predpokladá prebiehajúcu fibrózu a vývoj cirhózy. Signifikantne zvýšené hladiny P-III-P sa zistili u pacientov s chronickou alkoholovou hepatitídou (Gabrielli, 1989) a stupeň vzostupu bol výraznejší pri ťažkej fibróze v porovnaní s ľahkou fibrózou. Praktické využitie určenia P-III-P má význam v prognóze vývoja chronického etylo toxického poškodenia pečene, a to jednak v odlišení fibrózy od steatózy ako aj v odlišení fibrózy progredujúcej do cirhózy. P-III-P pomáha odlišiť aktívnu formu ochorenia od neaktívnej — stabilizovanej formy, či už pri chronickej aktívnej hepatitíde alebo cirhóze (Plebani, 1991).

Pri primárnej biliárnej cirhóze sa zistila signifikantná korelácia medzi hladinou P-III-P a stupňom histologického poškodenia — najvyššie hladiny boli namerané u pacientov s III. a IV. stupňom ochorenia (Plebani, 1991).

S extrahepatálnou sekréciou P-III-P sa stretávame pri fibrotizujúcich procesoch, ako sú Pagetova choroba, sklerodermia, pľúcna fibróza a reumatoidná artritída.

V pokročilom štádiu cirhózy pečene sa stáva dominantným kolagén I. typu, čím možno vysvetliť normálne hladiny P-III-P u týchto pacientov.

Prokolagén I. typu neodráža natoľko aktivitu ochorenia ako P-III-P, jeho hladina je však vyššia pri etylo toxickom poškodení oproti nealkoholickej etiológii (Hartmann, 1990). Prokolagén IV. typu je ďalším typom kolagénu. Použitím metódy RIA môžeme detegovať buď dva karboxyterminálne konce, ktoré označujeme ako NC-1, alebo štyri aminoterminálne konce, známe ako 7s-kolagén. Zvýšená hladina oboch koncových reťazcov sa zistila u pacientov s etylo toxickou hepatopatiou a na experimentálnom modeli pečeneovej fibrózy (Hayasaka, 1990). Pri cirhóze je metabolizmus kolagénu IV. typu celkom odlišný od kolagénu III. typu. Niektorí autori predpokladajú, že vzostup kolagénu IV. typu môže upozorniť na fibrogenézu včasnšie ako metabolizmus P-III-P (Savolainen, 1988; Ueno, 1992). Určenie reťazcov NC1 môže preto priniesť prídavnú informáciu o vývoji pečeneového ochorenia najmä u pacientov s normálnymi hladinami P-III-P. Hayasa-

ka (1990) zistil v skupine 60 pacientov s chronickým ochorením pečene (pričom 50 zdravých osôb tvorilo kontrolný súbor) tieto výsledky: hladiny NC1 sú signifikantne vyššie u pacientov s chronickou aktívnou hepatitídou a cirhózou v porovnaní s chronickou perzistujúcou hepatitídou. V skupine s cirhózou sa zistili vyššie hladiny NC1 oproti skupine s chronickou aktívnou hepatitídou. V skupine pacientov s cirhózou hladiny NC1 boli vyššie v aktívnom procese v porovnaní s neaktívnou cirhózou. Oproti predchádzajúcim zisteniam, že pri pokročilom stupni cirhózy nedochádza k adekvátnemu vzostupu P-III-P, hladiny kolagénu IV. typu sa zvyšujú kontinuálne so stupňom cirhózy určeným patologickoanatomickým obrazom (stupeň fibrózy, celulárna infiltrácia atď.) (Ueno, 1992). Japonskí autori dokázali signifikantne vyššie hladiny kolagénu IV — 7s u pacientov s hepatocelulárnym karcinómom oproti skupine s chronickým hepatálnym ochorením bez karcinómu pečene pri hepatitíde C, nie však pri hepatitíde B (Shimamura, 1995). Zdá sa, že 7s kolagén môže byť užitočným prognostickým faktorom pre riziko karcinogenézy pri hepatitíde C.

Laminín

V zdravej pečeni sa laminín nachádza v bazálnej membráne okolo žľčovodov, lymfatických ciev, nervových zakončení a vén, ale chýba na stenách sinusoidov, ktoré nemajú bazálnu membránu. Pri experimentálne vyvolanej fibróze sa laminín ukladá v depozitoch do Disseho priestorov s kolagénom IV. typu a zodpovedá za perivenulárnu a pericelulárnu fibrózu (Tsutsumi, 1993). Sasaki a spol. (1992) zistili zvýšené hladiny laminínu u pacientov s vrodenou atériou žľčovodov. Hladina dobre korelovala s hladinou aminotransferáz, bilirubínu, ako aj so stupňom hepatálnej fibrózy.

Výška hladiny laminínu závisí od stupňa orgánovej fibrózy. Zvýšené hodnoty boli opísané pri etylo toxickom poškodení pečene, pričom najvyššie hodnoty sa zistili u pacientov s etylo toxickou cirhózou (Tsutsumi, 1995). Koncentrácie laminínu boli signifikantne zvýšené u pacientov s ezofágovými varixami a koncentrácia laminínu korelovala so stupňom varixov klasifikovaných podľa Paqueta (Paquet, 1983). Obsah laminínu koreloval aj so zvýšením kolagénu IV. typu (Tsutsumi, 1995) a so stupňom fibrózy určeným na základe histologického vyšetrenia, pričom korelácia s P-III-P bola oveľa nižšia (Misaki, 1990). Pozitívne korelácie sa zistili aj medzi výškou portálneho tlaku a hladinou laminínu (Gresner, 1986). Vytváranie bazálnych membrán pozdĺž sinusoidových buniek vedie ku kapilarizácii sinusoidov, ktorá sa považuje za dôležitý patogenetický faktor vo vývoji portálnej hypertenzie (Urahima, 1993).

Fibronektín

Fibronektín je glykoproteín, ktorý je zložkou bazálnych membrán, ktoré sa s vysokou afinitou viažu ku kolagénom, najmä kolagénom III. typu. Pokles hladiny fibronektínu v sére pacientov s cirhózou koreluje s ďalšími ukazovateľmi proteosyntézy, ako je albumín (Plebani, 1991). Aj keď nie je priamo iniciátorom alebo regulátorom fibrogenézy v pečeni, má významné postavenie pri tvorbe extracelulárnej matrix, a tým sa zúčastňuje na procese fibrogenézy (Roeb, 1993).

Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je polysacharid, ktorý je významne zastúpený v spojivovom tkanive. Tvorí sa v mezenchýmových bunkách a prostredníctvom lymfy sa dostáva do krvi. Rýchlo sa vychytáva pečeňou a zhromažďuje sa v neparenchýmovej bunkovej frakcii. Len endotelové bunky v pečeni sú schopné zhromažďovať a odbúravať kyselinu hyaluronovú. Hepatocyty ani Kupfferove bunky túto schopnosť nemajú (Plebani, 1991). Signifikantne vyššie hladiny kyseliny hyaluronovej sa zistili u pacientov s chronickou aktívnou hepatitídou oproti skupine zdravých osôb. Nesignifikantný rozdiel bol v skupine necirhotického etylo toxického poškodenia pečene, chronickej perzistujúcej hepatitíde a liekmi indukovaného poškodenia pečene. Signifikantne vysoké hodnoty sa zistili u pacientov s cirhózou oproti skupine bez cirhózy. Štatistické analýzy zistili pozitívne korelácie medzi hladinou kyseliny hyaluronovej a niektorými pečevnými testmi (galaktózový tolerančný test, protrombínový čas, albumín, bilirubín, aspartátaminotransferáza v sére). Kombinácia vyšetrenia kyseliny hyaluronovej, alkalické fosfatázy a galaktózového tolerančného testu predstavuje výborný prognostický faktor pri hodnotení priebehu ochorenia. Hladina kyseliny hyaluronovej môže poukázať na prítomnosť a zhoršenie funkcie pečene už vo včasných štádiách primárnej biliárnej cirhózy v predstihu pred bežne používanými pečevnými testmi okrem prealbumínu (Nyberg, 1992). Kyselina hyaluronová dokáže odlišiť včasné štádiá primárnej biliárnej cirhózy (I.—II. štádium) od pokročilého stupňa s fibrózou (III. štádium) alebo od cirhózy (IV. štádium). Súčasné poznatky poukazujú na to, že kyselina hyaluronová je citlivejším markerom fibrogenézy v porovnaní s P-III-P nielen pri primárnej biliárnej cirhóze, ale aj chronickej hepatitíde C (Nyberg, 1992; Guechot, 1994). Hladina kyseliny hyaluronovej odráža morfológické a funkčné zmeny, ktoré nachádzame na sínusoidových bunkách v zmysle sínusoidovej kapilarizácie pri rôznych hepatálnych ochoreniach (Kimura, 1993; Ueno, 1993).

Tenascín

Tenascín je glykoproteín extracelulárneho matrixu. Jeho signifikantne zvýšená hladina sa zistila u pacientov s chronickou aktívnou hepatitídou, cirhózou pečene, hepatocelulárnym karcinómom a akútnou hepatitídou v porovnaní so skupinou zdravých osôb (Yamauchi, 1993). Pozitívne korelácie sa zistili aj pri porovnaní sérovej hladiny tenascínu s histologickým nálezom stupňa fibrózy. Hladina tenascínu korelovala s hladinami iných markerov fibrogenézy (P-III-P, 7s-kolagén IV. typu, laminín).

Prolyl 4-hydroxyláza

Prolyl-4-hydroxylázu môžeme určovať buď priamo z pečevného tkaniva alebo zo séra. Vzostup pečevnej prolyl-4-hydroxylázy sa zistil pri chronickej aktívnej hepatitíde, cirhóze, primárnej biliárnej cirhóze aj akútnej vírusovej hepatitíde a považuje sa za užitočný index fibroblastickej aktivity pri ochoreniach pečene. Zvýšená hladina enzýmu sa pozorovala aj pri etylo toxických hepatopatiách okrem steatózy. U pacientov s etylo toxickou hepatitídou sa zistila najvyššia aktivita tohto enzýmu, nepozorovala sa však korelácia enzymovej aktivity s tukovou infiltráciou pečene (Ple-

bani, 1991). Enzým nie je prognostickým faktorom hepatálnej fibrózy u detí.

Viaceri autori zistili signifikantne vyššej hladiny sérovej prolyl-4-hydroxylázy u pacientov s akútnou vírusovou hepatitídou, chronickou aktívnou hepatitídou, cirhózou pečene a etylo toxickým poškodením pečene v porovnaní so zdravými osobami. Zistila sa aj korelácia medzi hladinou enzýmu a stupňom hepatálnej fibrózy v histologickom obraze, ako aj s hladinou P-III-P (Plebani, 1991). Iní autori pozorovali zvýšené hladiny enzýmu pri akútnej hepatitíde, hepatocelulárnom karcinóme, metastatickom postihnutí pečene a cholestatických ochoreniach (Nagai, 1988). Najvyššie hodnoty sa pozorovali pri cholestatických ochoreniach.

Lyzyloxidáza

Lyzyloxidáza je enzým, ktorý iniciuje syntézu kolagénu a elastínu ako katalyzátor oxidačno-deaminačnej reakcie. Niektorí autori zistili eleváciu hladín pri chronickej aktívnej hepatitíde, primárnej biliárnej cirhóze a etylo toxickkej hepatopatii, nezistila sa však korelácia s histologickým stupňom fibrózy ani s P-III-P a aktivitou monoaminoxidázy (Sakamoto, 1985).

Galaktozyl-hydroxy-lyzyl-glukozytransferáza

Zvýšenie enzýmu sa pozorovalo pri cirhóze pečene, akútnej hepatitíde a metastázach pečene. Aktivita enzýmu koreluje so sérovou prolyl-4-hydroxylázou a s inými markermi cytolýzy (aspartátaminotransferáza) alebo cholestázy (alkalická fosfatáza) (Plebani, 1991).

Monoaminoxidáza

Úloha monoaminoxidázy v metabolizme spojivového tkaniva pečene nie je presne známa, ale predpokladá sa, že enzým je zapojený do tvorby kolagénu alebo elastínu. Zvýšená hladina monoaminoxidázy je indikátorom pokročilej fibroproliferácie v pečeni s pomerne vysokou špecificitou, aj keď nedokáže postrehnúť ľahký stupeň fibrózy (Plebani, 1991).

N-acetyl-beta-D-glukozaminidáza

Ide o lyzozómový enzým, ktorý katabolizuje proteoglykány a glykoproteíny. Predpokladá sa, že je hodnotným indikátorom fibrózy a cirhózy. Pri chronickej aktívnej hepatálnej ochoreni koreluje so stupňom fibrózy a s hladinami P-III-P. Pozorovala sa aj zvýšená aktivita pri akútnej hepatitíde, diabete a artritídach. Jeho senzitivita je 52 %, špecifická 34 %, pozitívna prediktívna hodnota 9 % a negatívna prediktívna hodnota 98 % pre hepatálnu fibrózu pri chronických pečevných ochoreniach (Gressner, 1982).

Kolagenázy a peptidázy

Odbúravanje kolagénu je multienzymový proces sprevádzaný kolagenázami a ďalšími proteolytickými enzýmami. Jedným z podporných faktorov podmieňujúcich vývoj cirhózy je znížená aktivita kolagenázovej aktivity, ktorá môže súvisieť s hladinami inhibítorov, akým je napr. sérový tkanivový inhibítor metaloproteinázy (TIMP-1). Viacerí autori zistili jeho zvýšenú hladinu u pacien-

to v vzťahu s vývojom fibrózy a stupňom cirhózy. V porovnaní s P-III-P má TIMP-1 väčšiu senzitivitu v určení stupňa fibrózy, dokáže citlivo detegovať aj perivenulárnu fibrózu (Li, 1994). Celková senzitivita TIMP-1 v určení fibrózy je 71 % (Li, 1994).

Záver

Význam biochemických markerov fibrogenézy v klinickej praxi je nesporný. Fibróza pečene predstavuje dynamický proces, zahrňujúci početné interakcie medzi niekoľkými typmi buniek, v dôsledku ktorých dochádza k nahromadeniu bielkovín extracelulárneho matrixu. Dôsledkom prerušenia intrahepatálneho krvného toku je vývoj portálnej hypertenzie. Hlavnou zložkou bielkovín extracelulárnej matrix sú perisinusoidové bunky, ktoré sa nachádzajú v Disseho priestoroch. Tieto bunky proliferujú a podporujú ďalšiu hepatálnu nekrózu. Tento proces ovplyvňujú rôzne mediátory, vrátane cytokínov a rastových faktorov (TGF-beta, PDGF a ďalšie). Pri chronickom hepatálnom ochorení je výsledkom týchto dejov fenotypická premena perisinusoidových buniek na myofibroblasty. Akumuláciu proteínov extracelulárnej matrix pri fibróze možno vysvetliť nielen ich zvýšenou syntézou, ale aj zníženým odbúraním, t.j. zníženou aktivitou kolagenázy. Na posúdenie tohto dynamického deja sú nevyhnutné neinvazívne, široko dostupné markery.

Klinické využitie týchto metód nie je všeobecne akceptované a využívané. V našich podmienkach ide o finančnú náročnosť uvedených metód, aj keď je to paradoxné, keď si uvedomíme, že racionálna diagnostika efektu liečby by viedla k použitiu efektívnejších terapeutických postupov a z toho vyplývajúcejmu zníženiu nákladov v konečnom dôsledku. Čiastkovou nevýhodou týchto testov je, že žiaden z nich nie je orgánovo-spezifický, aj keď extrahepatálne prejavy možno ľahko určiť z klinického obrazu a základných laboratórnych parametrov. Perspektívou využitia markerov fibrogenézy je kontinuálne sledovanie priebehu ochorenia a vplyvu farmakoterapeutických postupov na reverziu fibrotického procesu.

Literatúra

Annoni G., Donato M.F., Cantaluppi C. a spol.: Serum procollagen type III peptide levels in patients with acute viral hepatitis. *Res. Clin. Lab.*, 18, 1988, s. 37–44.

De Groot H., Sies H.: Role of reactive oxygen species in fibrogenesis. In: Gressner A.M., Ramadori G. (Eds.): *Molecular and cell biology of liver fibrogenesis*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers 1992, 555 s.

Diodati G., Bonetti P., Plebani M. a spol.: Cryptogenic chronic active liver diseases. Evaluation of serum amino-terminal type III procollagen peptide as a marker of histological activity. *Res. Clin. Lab.*, 20, 1990, s. 269–274.

Change Y.T., Lin H.C., Lee S.D. a spol.: Clinical significance of serum type III procollagen aminopropeptide in hepatitis B virus-related liver disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 24, 1989, s. 533–538.

Gabrielli G.B., Faccioli G., Casaril M. a spol.: Procollagen III peptide and fibronectine in alcohol related chronic liver disease, correlation with morphological features and biochemical tests. *Clin. Chim. Acta*, 179, 1989, s. 315–322.

Gressner A.M., Meyer D.: The role of proteoglycans in liver fibrogenesis. In: Gressner A.M., Ramadori G. (Eds.): *Molecular and cell biology*

of liver fibrogenesis. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers 1992, 555 s.

Gressner A.M., Roebuck P.: Predictive values of serum N-acetyl-(D-glucosaminidase for fibrotic liver disorders — correlation with monoamine oxidase activity. *Clin. Chim. Acta*, 124, 1982, s. 315–326.

Guehot J., Poupon R.E., Giral P., Balkau B., Giboudeau J., Poupon R.: Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histopathological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis. *Clin. J. Hepatol.*, 20, 1994, č. 3, s. 388–393.

Hartmann D.J., Trinchet J.C., Ricard-Blum S., Beaugrand R., Cal-lard P., Ville G.: Radioimmunoassays of type I collagen that mainly detects degradation products in serum: application to patients with liver diseases. *Clin. Chem.*, 36, 1990, s. 421–426.

Hayasaka A., Schuppan D., Ohnishi K., Okuda K., Hahn E.G.: Serum concentrations of the carboxyterminal cross-linking domain of procollagen type IV (NC1) and the aminoterminal propeptide of procollagen type III (PIIIP) in chronic liver disease. *J. Hepatology*, 10, 1990, s. 17–22.

Hirota N., Geerts A., Wisse E.: Tenascin expression in human chronic liver disease and in hepatocellular carcinoma. *Liver*, 12, 1992, č. 1, s. 10–16.

Kimura Y., Inuzuka S., Torimura S. a spol.: Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization. *Gastroenterology*, 105, 1993, č. 2, s. 475–481.

Kupčová V., Turecký L., Brixová E.: Eliminačná kapacita pre galaktózu a proteosyntetická funkcia pečene pri chronických hepatopatiách. *Bratisl. lek. Listy*, 95, 1994, č. 9, s. 395–401.

Kupčová V., Turecký L., Uličná O., Volmut J., Božek P., Brixová E.: Prospektívne sledovanie aktivity biotransformačného enzýmového systému pri pečevných ochoreniach. *Čs. Gastroent. Výž.*, 44, 1990, s. 269–270.

Kupčová V., Turecký L., Synak R., Glasa J.: Bielkoviny krvného séra u pacientov s chronickými ochoreniami pečene a liečba Flavobionom II. Ukazovatele proteosyntetickej funkcie pečene. *Čs. Gastroent. Výž.*, 43, 1989, č. 1, s. 3–12.

Kupčová V., Turecký L., Uhlíková E., Brixová E., Holomáň J.: Zmeny niektorých bielkovinových parametrov v sére pacientov s alkoholickými hepatopatiami. *Čas. Lék. čes.*, 126, 26, 1987, s. 825–828.

Kupčová V., Turecký L., Szántová M., Beláček J.: Galactose elimination capacity and proteosynthetic liver function in liver cirrhosis with portal hypertension and in patients after liver resection. S. 123–128. In: Monduzi (Ed.): *2nd World Congress International Hepato-Pancreato-Biliary Association*, Bologna, Italy, June 2–6, 1996, I. Liver, International Proceedings Division. Bologna, 1996, 507 s.

Kupčová V., Turecký L., Szántová M., Volmut J.: Long term assessment of liver biotransformation function and its relation to protein metabolism in liver cirrhosis with portal hypertension. S. 129–134. In: Monduzi (Ed.): *2nd World Congress International Hepato-Pancreato-Biliary Association*, Bologna, Italy, June 2–6, 1996, I. Liver, International Proceedings Division. Bologna, 1996, 507 s.

Kupčová V., Szántová M., Turecký L., Schmidtová K.: Lidocaine Metabolism as an Index of Liver Function. S. 20–21. In: *Abstracts of 27th May Days of Hepatology*, 23 s.

Li J., Rosman A.S., Leo M.A., Nagši Y., Lieber C.S.: Tissue inhibitor of metalloproteinase is increased in the serum of precirrhotic and cirrhotic

- alcoholic patients and can serve as a marker of fibrosis. *Hepatology*, 19, 1994, č. 6, s. 1418—1423.
- Lissoos T.W., Davis B.H.:** Pathogenesis of hepatic fibrosis and the role of cytokines. *J. clin. Gastroenterol.*, 15, 1992, č. 1, s. 63—67.
- Martinez-Hernandez A., Amenta P.S.:** The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 423, 1993, č. 1, s. 1—11.
- Meyer zum Buschenfelde K.H.:** Liver fibrogenesis: research developments. In: Gressner A.M., Ramadori G. (Eds.): *Molecular and cell biology of liver fibrogenesis*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers 1992, 555 s.
- Misaki M., Shima T., Zano Z. a spol.:** Basement membrane-related and type III. Procollagen-related antigens in serum of patients with chronic viral liver disease. *Clin. Chem.*, 36, 1990, č. 3, s. 522—524.
- Murata K., Kuolo F., Motoyama T.:** Changes of collagen types at various stages of human liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology*, 31, 1984, s. 158—161.
- Nagai Y., Yoshida M.:** Studies on serum immunoreactive prolyl-4-hydroxylase in liver diseases — its elevation both in hepatocellular damage and cholestatic diseases. *Jap. J. Gastroenterol.*, 20, 1985, s. 53—64.
- Nyberg A., Lindquist U., Engstrom-Laurent A.:** Serum hyaluronan and aminoterminal propeptide of type III procollagen in primary biliary cirrhosis: relation to clinical symptoms, liver histopathology and outcome. *Hepatology*, 231, 1992, č. 5, s. 485—491.
- Paquet K.J., Kalk H.F., Feussner H.:** Endoskopisch-chirurgische Therapie der Oesophagus Varizen. *Therapiewoche*, 33, 1983, s. 191—195.
- Plebani M., Burlina A.:** Biochemical markers of hepatic fibrosis. *Clin. Biochem.*, 24, 1991, s. 219—239.
- Raedesch R., Stiehl A., Crygan P., Kommerell B.:** Procollagen type III peptide: serum concentrations, renal and biliary excretion in chronic liver disease. *Gastroenterology*, 82, 1982, s. 1240.
- Rauterberg J., Voss B., Pott G., Gerlach U.:** Connective tissue components of the normal and fibrotic liver. *Klin. Wschr.*, 59, 1981, s. 767—779.
- Roeb E., Matern S.:** Fibronectin — a key substance in pathogenesis of liver cirrhosis? *Leber-Magen-Darm*, 23, 1993, č. 6, s. 239—242.
- Sakamoto M., Murawaki Y., Hirayama C.:** Serum lysyl oxidase activity in patients with various liver diseases: comparison with serum monoamine oxidase and procollagen III peptide. S. 209—216. In: Hirayama C., Kivirikko K.I. (Eds.): *Pathobiology of hepatic fibrosis*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers 1985.
- Sasaki F., Hata Y., Hamada H., Takahashi H., Uchino J.:** Laminin and procollagen-III-peptide as a serum marker for hepatic fibrosis in congenital biliary atresia. *J. Pediatr. Surg.*, 27, 1992, č. 6, s. 700—703.
- Savolainen E.R., Brocks D., Ala-Kokko L., Kivirikko K.:** Serum concentrations of the N-terminal propeptide of type III procollagen and two type IV collagen fragments and gene expression of the respective collagen types in liver in rats with dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis. *Biochem. J.*, 249, 1988, s. 753—757.
- Scholmerich J., Holstege A.:** Aetiology and pathophysiology of chronic liver disorders. *Drugs*, 40, 1990, Suppl. 3, s. 3—22.
- Shimamura T., Nakajima Y., Une Y., Uchino J.:** Serum levels of the type IV collagen 7s domain in patients with chronic viral liver diseases: A possible risk factor of hepatocellular carcinoma. *Intern. J. Oncol.*, 8, 1996, s. 153—157.
- Szántová M., Kupčová V., Bada V., Goncalvesová E.:** Vývoj spotreby alkoholu vo vzťahu k ochoreniam pečene na Slovensku v rokoch 1973—1994. *Bratisl. lek. Listy*, 98, 1997, č. 1, s. 12—16.
- Tsakamoto A., Kaneko Y., Kurokawa K.:** Increased assembly of cytoskeletal proteins associated with the transformation of human liver cells into fibroblast-like cells. *Experimentia*, 48, 1992, č. 5, s. 495—497.
- Tsutsumi M., Urashima S., Nakase K., Takase S., Takada A.:** Type IV collagen and laminin contents of livers from patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol Suppl.*, 1A, 1993, s. 45—52.
- Tsutsumi M., Urashima S., Nakase K., Takada A.:** Changes in laminin content in livers of patients with alcoholic liver disease. *Liver*, 15, 1995, s. 324—331.
- Turecký L., Kupčová V., Synak R., Glasa J.:** Bielkoviny krvného séra u pacientov s chronickými ochoreniami pečene a liečba Flavobionom. I. Bielkoviny akútnej fázy. *Čs. Gastroent. Výž.*, 42, 1988, č. 7, s. 424—429.
- Turecký L., Uhlíková E., Laktiš K., Kupčová V., Kriako J.:** Prealbumín a albumín v priebehu akútnej vírusovej hepatitídy. *Čs. Gastroent. Výž.*, 39, 1985, č. 3, s. 202.
- Turecký L., Laktiš K., Kupčová V., Uhlíková E.:** Dynamika zmien niektorých bielkovinových parametrov v priebehu akútnej vírusovej hepatitídy. *Čs. Gastroent. Výž.*, 42, 1988, č. 7, s. 424—429.
- Ueno T., Inuzuka S., Torimura T. a spol.:** Significance of serum type-IV collagen levels in various liver disease. Measurement with a one-step sandwich enzyme immunoassay using monoclonal antibodies with specificity for pepsin-solubilized type-IV collagen. *Scand. J. Gastroenterol.*, 27, 1992, č. 6, s. 513—520.
- Ueno T., Inuzuka S., Torimura T. a spol.:** Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization. *Gastroenterology*, 105, 1993, s. 475—481.
- Urashima S., Tsutsumi M., Nakase K., Wang J.S., Takada A.:** Studies on capillarization of the hepatic sinusoids in alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*, 28, 1993, s. 77—84.
- Wake K.:** Perisinusoidal stellate cells (fat storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and A-storing cells in extrahepatic organs. *Intern. Rev. Cytol.*, 66, 1980, s. 303—353.
- Yamauchi M., Mizuhara Y., Maezawa Y., Toda G.:** Serum tenascin levels in chronic liver disease. *Liver*, 14, 1994, č. 3, s. 148—153.

Do redakcie došlo 24.3.1998.