at presence of sufficient anti-infectious protection on the first year of life at children with prolonged conjugate icterus in conditions of vaccination against hepatitis B, great value has definition of a level of general reactive potential of the organism. At revealing of immunodepression of various degree the necessity of newborns vaccination against hepatitis B is defined individually.

© Андрейчин М.А., Кубацький В.В., 2006
УДК 616.36-002.14-022.7:578.891

М.А. Андрейчин, В.В. Кубацький

ТРОМБОМОДУЛІН І ФАКТОР ВІЛЛЕБРАНДА ЯК МАРКЕРИ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С

Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського

Вивчено діагностичну цінність тромбомодуліну та фактора Віллебранда як маркерів ендотеліальної дисфункції у хворих на хронічний гепатит С (ХГС). Встановлено, що рівні зазначених маркерів відображають активність запального процесу в печінці та корелюють з іншими лабораторними показниками – аланінамінотрансферазою (АлАТ), тимоловою пробою, протромбіновим індексом і кріоглобулінемією.

Гепатит С (ГС) продовжує залишатись однією з найбільш актуальних проблем інфектології як найчастіша причина розвитку хронічного гепатиту, цирозу печінки, гепатоцелюлярної карциноми [1]. Незважаючи на інтенсивне дослідження механізмів пошкодження печінки, спричиненого вірусом гепатиту С (HCV), це питання залишається недостатньо висвітленим, остаточно не розкритий і патогенез позапечінкових проявів ГС.

Останнім часом особливу увагу науковців привертає роль ендотелію у патогенезі HCV-асоційованого гепатиту. На місцевому рівні ендотелій утворює стінку печінкових гемокапілярів – синусоїдів, які забезпечують обмін між кров'ю і гепатоцитами, у ширшому розумінні ендотеліальна вистилка судин організму розглядається як самостійний активний орган, що забезпечує гомеостаз судинної стінки і є важливим бар'єром на шляху поширення та розвитку інфекції [2]. Відомо, що в патогенезі хронічного гепатиту важливу роль відіграють мікроциркуляторні порушення, зокрема судинна недостатність передує паренхіматозній і відмічається навіть за відсутності значних функціональних розладів печінки [3]. З іншого боку, активація В-клітинної ланки імунітету при HCV-інфекції призводить до імуноопосередкованого ушкодження печінки. Процес антигенного розпізнавання інфікованих гепатоцитів імунокомпетентними клітинами здійснюється за участі молекул, що експресуються на ендотелії синусоїдних гемокапілярів [4]. За схожим механізмом відбувається трансендотеліальне проникнення HCV в гепатоцит, а саме через адгезію білків оболонки збудника до специфічних рецепторів печінкового ендотелію, що може пояснити механізм гепатотропізму вірусу [5, 6].

Крім локальних реакцій, що обмежуються ендотелієм печінкових синусоїдів, є дані про ураження ендотелію судин поза межами печінки. Так, HCV РНК виявлено при гістологічному дослідженні тканин в ендотеліоцитах і периваскулярних клітинах пацієнтів зі шкірними ураженнями, асоційованими з ГС, що дозволило розробити гіпотезу про вірусний паразитизм в ендотелії та його роль у патогенезі позапечінкових проявів ГС, разом з пошкоджувальною дією HCV-інфікованих В-лімфоцитів, циркулюючих імунних комплексів і кріоглобулінів [7].

Молекули, які експресуються ендотелієм та є маркерами його активації і пошкодження, існують в розчинних формах у кровоносному руслі. Їх можна ідентифікувати якісно та кількісно лабораторн-

ними методами. Зокрема, високочутливими тестами є визначення в периферичній крові вмісту тромбомодуліну та фактора Віллебранда. Тромбомодулін є поверхневим глікопротеїном ендотеліоцитів, який бере участь у процесах коагуляції крові та фібринолізису. При пошкодженні ендотелію тромбомодулін виділяється в кров у розчинній формі, причому його концентрація у крові корелює зі ступенем пошкодження ендотелію [3, 8]. Фактор Віллебранда є адгезивним глікопротеїном, який накопичується в секреторних гранулах ендотеліальних клітин і субендотеліальному матриксі. Він регулює початкову адгезію тромбоцитів до субендотелію і плазмовий рівень VIII фактора згортання крові. Рівень фактора Віллебранда у крові підвищується при стимуляції ендотелію цитокінами та при його пошкодженні [9].

Зважаючи на недостатнє висвітлення в доступній світовій літературі питання взаємозв'язку маркерів активації та ушкодження ендотелію з проявами HCV-інфекції, метою дослідження стало вивчення вмісту тромбомодуліну та фактора Віллебранда у крові хворих на ХГС, їх зміни залежно від активності перебігу хвороби та кореляція з демографічними (вік, стать) й лабораторними показниками (активністю АлАТ, кріоглобулінемією, показником тимолової проби і протромбіновим індексом).

Матеріали і методи

Обстежено 40 хворих на ХГС – 30 чоловіків (75 %) і 10 жінок (25 %), віком від 17 до 70 років (у середньому 40 років). Усі пацієнти були клінічно стабільні, особи з мікст-гепатитом В+С, декомпенсованими супутніми соматичними захворюваннями, ВІЛ-інфіковані у дослідження не включались.

Етіологічне підтвердження діагнозу HCV-інфекції здійснювали за допомогою імуноферментного аналізу з використанням тест-систем 3-го покоління для визначення анти-HCVcor IgG та IgM у сироватці крові. В частини хворих (10 осіб) діагноз підтверджено виявленням HCV РНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції якісним методом. Діагноз ХГС встановлювали згідно з Міжнародною класифікацією хвороб X перегляду та класифікацією, прийнятою на Міжнародному конгресі гастроентерологів (WCOG, Лос-Анджелес, 1994 р.), за тривалості клініко-лабораторної симптоматики гепатиту більше 1 року.

Відповідно до мети дослідження, хворі були поділені на 2 групи: I включала 19 пацієнтів з латентним перебігом ХГС, II – 21 хворого з реактивацією гепатиту. Латентна форма ХГС характеризувалася субклінічним перебігом, відсутністю скарг, незначною гепатомегалією, підвищенням активності АлАТ не більш як у 2-3 рази, наявністю у всіх хворих анти-HCVcor IgG та в деяких – IgM у низьких титрах. Фаза реактивації діагностувалась за наявності розгорнутої клінічної картини хронічного гепатиту, з вираженою гепатомегалією, постійною гіперферментемією, наявністю у хворих анти-HCVcor IgM та вірусної РНК у крові [1].

Забір крові для дослідження здійснювали перед початком лікування. Біохімічні обстеження (визначення активності АлАТ, протромбінового індексу, тимолової проби) проводили стандартними методами.

Вміст кріоглобулінів визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 500 нм за різницею оптичної щільності розчинів сироватки у веронал-мединаловому буфері (pH 8,6), інкубованих протягом години при температурах відповідно 4 і 37 °С [10]. Рівень кріоглобулінемії (КГЕ) визначали за формулою:

$$КГЕ\ (\%)=(D_2-D_1)/D_2,$$

де D_2 – оптична щільність зразка, інкубованого протягом години при температурі 4 °С;

D_1 – оптична щільність зразка, інкубованого протягом години при температурі 37 °С.

Для визначення тромбомодуліну та фактора Віллебранда кров забирали натще в пробірки з 3,8 % розчином натрію цитрату, центрифугували при 3 000 об./хв протягом 10 хв для відділення плазми, отримані зразки зберігались при температурі -20 °С до проведення аналізу. Рівень тромбомодуліну визначали імуноферментним методом з використанням тест-системи виробництва фірми *Diaclone* (Франція). Нормальна концентрація тромбомодуліну, за даними виробника тест-системи, становить (4,46±1,36) нг/мл. Фактор Віллебранда визначали імуноферментним методом з використанням тест-системи виробництва фірми *Shield Diagnostics* (Великобританія). Вміст фактора Віллебранда розраховували у відсотках від стандартної проби за калібровочною кривою. Нормальні межі активності фактора Віллебранда, за даними виробника тест-системи, становлять (120±7) %, що підтверджено і в інших дослідженнях [11].

Статистичний аналіз отриманих показників проводили з використанням критерію Ст'юдента та лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона. Значення $P<0,05$ вважали статистично достовірними.

Результати досліджень та їх обговорення

У всіх обстежених хворих рівні тромбомодуліну та фактора Віллебранда перевищували норму ($P<0,05$), причому у пацієнтів II групи (реактивація ГС) ці показники були вищими, ніж у пацієнтів I групи (латентний перебіг ГС, табл. 1).

Середні величини біохімічних і демографічних показників обстежених пацієнтів зіставлено зі значеннями досліджених маркерів ендотеліальної дисфункції (табл. 2).

Таблиця 1

Показники тромбомодуліну та фактора Віллебранда у хворих на ХГС (M±m)

Показник	Здорові люди (норма)*	Хворі на ХГС		
		разом, n=40	I група, n=19	II група, n=21
Тромбомодулін, нг/мл	4,46±1,36	14,17±0,75 P[1]<0,05	10,87±0,75	17,15±0,83 P[2]<0,05
Фактор Віллебранда, %	120±7	175±6 P1<0,05	160±9	188±7 P2<0,05

Примітки: * – за даними виробників тест-систем; P1 – показник достовірності порівняно з нормою; P2 – різниця між I і II групами.

Таблиця 2

Деякі біохімічні та демографічні показники обстежених хворих і їх кореляційний зв'язок з рівнями тромбомодуліну та фактора Віллебранда

Показник	Середня величина (M±m), n=40	Лінійний коефіцієнт кореляції Пірсона (r)	
		Тромбомодулін	Фактор Віллебранда
АлАТ, ммоль/(л×год)	1,95±0,21	0,58	0,38
Тимолова проба, од.	8,42±0,93	0,35	0,37
Протромбіновий індекс, %	82,65±1,53	-0,69	-0,53
Кріоглобулінемія, %	17,20±2,16	0,61	0,38
Вік, роки	40,0±2,6	-0,15	-0,08
Стать, чол./жін.	30/10	0,03	0,21

Встановлено достовірну кореляцію між рівнем тромбомодуліну, фактора Віллебранда і рівнем АлАТ, тимолової проби, кріоглобулінемії (прямий зв'язок середньої сили), протромбінового індексу (зворотний зв'язок середньої сили). Вірогідної кореляції зі статтю і віком не виявлено. Лінійний коефіцієнт кореляції між тромбомодуліном і фактором Віллебранда склав 0,62 (прямий зв'язок середньої сили).

Підвищений рівень тромбомодуліну та фактора Віллебранда в обстежених пацієнтів, очевидно, є наслідком порушення структури гемокапілярів і/або підвищення експресії та виділення цих факторів з клітин ендотелію як мікроциркуляторного русла печінки, так, можливо, й інших відділів кровоносної системи організму, зважаючи на здатність вірусу ГС спричиняти позапечінкові судинні ураження. Отже, отримані дані підтверджують гіпотезу про розвиток ендотеліальної дисфункції при ХГС.

Механізмів пошкодження ендотелію при ГС може бути декілька. Так, у літературі є дані про безпосереднє інфікування ендотелію HCV [7, 12, 13], хоча пряма цитопатична дія вірусу на ендотеліоцити ще потребує підтвердження. Більш доведеною є схема HCV-індукованого ураження ендотеліальних клітин через каскад запальних реакцій, що також є важливою ланкою в патогенезі хронічного гепатиту. Білки HCV започатковують виділення прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкін-8 (ІЛ-8), і спричиняють апоптоз ендотелію [14]. Наші дослідження підтверджують ці дані, так як гіперекспресія тромбомодуліну та фактора Віллебранда є одним з компонентів запальної відповіді судинної стінки. Зокрема, тромбомодулін, крім своєї безпосередньої функції регулювання процесів згортання крові та фібринолізису, має протизапальну та цитопротекторну дію, сприяючи підтриманню цілісності ендотелію. При зменшенні експресії тромбомодуліну, що може траплятись внаслідок пригнічення його утворення під дією цитокінів або нейтрофіл-залежним протеолітичним відділенням розчинного тромбомодуліну від ендотеліальної мембрани, створюються умови, сприятливі для розвитку запального процесу [15]. З іншого боку, порушення структури ендотеліального моношару стимулює екскрецію фактора Віллебранда, який, у свою чергу, сприяє не тільки адгезії тромбоцитів до оголеного субендотелію, але й адгезії лейкоцитів до ендотеліальних клітин, теж сприяючи розвитку запалення [9, 16].

Серед можливих причин ендотеліальної дисфункції називають також циркулюючі імунні комплекси, такі як кріоглобуліни. Безпосередньо

пошкодження завдають фрагменти HCV, ревматоїдний фактор та IgG, які формуються *in situ* з компонентів циркулюючих у крові кріоглобулінів [13, 17]. Виявлена позитивна кореляція між рівнем маркерів пошкодження ендотелію та кріоглобулінемією свідчить на користь цієї гіпотези.

Клінічне значення отриманих результатів полягає в тому, що підвищення рівня маркерів пошкодження ендотелію в пацієнтів з ГС вказує на HCV-асоційовану персистуючу активацію ендотелію, яка, як відомо, сприяє підтриманню постійного вогнища запалення в печінці та сприяє її фіброзу. Пошкодження ендотеліальних клітин синусоїдних гемокапілярів призводить до активації печінкових мононуклеарів, підвищення продукції цитокінів, вільних радикалів і колагену, що, у свою чергу спричиняє зміни фенестрації ендотелію, колагенізацію простору Діссе, наростання внутрішньопечінкового судинного опору, зменшення кровонаповнення органу, розвиток ішемії та некрозу печінкової тканини з подальшим фіброзом [3]. Думку про важливу патогенетичну роль персистуючої активації ендотелію у розвитку хронічного гепатиту підтверджено також у дослідженнях впливу підвищеної експресії таких біологічно активних речовин, як ІЛ-8 і трансформуючий фактор росту β (TGF β), які мають стимулювальний вплив на процеси неоангіогенезу та фіброзу в печінці [18].

Виходячи з вищенаведеного, вагомим результатом проведеного дослідження є встановлення діагностичної цінності визначення рівнів тромбомодуліну та фактора Віллебранда в периферичній крові як маркерів хронічного запального процесу в печінці при ГС. Підтвердженням цьому є позитивна кореляція згаданих показників з рівнем активності АлАТ, оскільки цитоліз гепатоцитів з вивільненням у кров цитоплазматичних ферментів, у т.ч. АлАТ, є фактично кульмінацією запальної реакції. Важливий пошук таких маркерів, які могли б вказати на початок розвитку патологічного процесу, що дало б можливість провести швидку та адекватну терапевтичну корекцію. Такими маркерами, очевидно, можуть бути тромбомодулін і фактор Віллебранда як показники активації та ушкодження ендотелію, процесів, що передують масштабним некробіотичним змінам у печінці. Зважаючи на достовірну різницю між показниками рівнів тромбомодуліну та фактора Віллебранда у хворих I і II груп, можна стверджувати, що ці маркери вказують також на ступінь запального процесу в печінці. Відповідно визначення їх концентрації може бути використане для діагностики активності хронічного гепатиту.

Такі висновки опираються на попередні дані літератури. Зокрема, припущення про те, що підвищена експресія тромбомодуліну на ендотелії печінкових синусоїдів відображає запальні процеси в печінці при ХГС, підтверджене в дослідженні *in situ* [19]. В експерименті встановлено, що рівень тромбомодуліну відображає ступінь гострого пошкодження печінки з некрозом паренхіми і процес її регенерації. За змінами експресії тромбомодуліну можна судити про стан мікроциркуляції в ушкодженому органі, а підвищення рівня тромбомодуліну в периферичній крові є корисним маркером оцінки ступеня печінкової недостатності та ушкодження ендотелію синусоїдних гемокапілярів [20].

Привертає увагу й факт встановлення кореляції рівнів тромбомодуліну та фактора Віллебранда з показниками гемостазу (зворотний зв'язок середньої сили з протромбіновим індексом) і тимолової проби (прямий зв'язок середньої сили). Ці дані підтверджують значимість маркерів пошкодження ендотелію як показників порушення різних функцій печінки, зокрема синтетичної (утворення протромбіну, альбумінів).

Висновки

1. Підвищення рівнів тромбомодуліну та фактора Віллебранда у сироватці крові є об'єктивним критерієм розвитку ендотеліальної дисфункції у хворих на ХГС.

2. В основі патогенезу HCV-асоційованої ендотеліальної дисфункції, ймовірно, лежить порушення структури ендотеліального моношару як мікроциркуляторного русла печінки, так, можливо, й інших судин організму, і/або підвищення експресії та виділення біологічно активних речовин з клітин ендотелію у периферичну кров.

3. Концентрація тромбомодуліну та активність фактора Віллебранда відображають ступінь запального процесу в печінці, а їх визначення може бути використане для оцінки активності хронічного гепатиту С.

4. Виявлена кореляція між показниками маркерів ендотеліальної дисфункції та рівнем кріоглобулінемії дозволяє припустити участь кріоглобулінів у процесах активації та ушкодження ендотелію.

Література

1. Малый В.П. Хронический гепатит С: клиника, диагностика, лечение // Лікування та діагностика. – 2004. – № 2.– С. 18-24.

2. McGill S.N., Ahmed N.A., Christou N.V. Endothelial cells: role in infection and inflammation // World J. Surg. – 1998. – V. 22, N 2. – P. 171-178.

3. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / Под ред. Н.Н. Петрищева. – СПб: Изд-во СПбГМУ, 2003. – 184 с.

4. Lo Iacono O., Garcia-Monzon C., Almasio P. et al. Soluble adhesion molecules correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C treated with interferon-alpha // Aliment. Pharmacol. Ther. – 1998. – V. 12, N 11. – P. 1091-1099.

5. Nahmias Y. Liver endothelial cells promote Ldl-R expression and the uptake of HCV-like particles in primary hepatocytes // http://aiche.confex.com/aiche/2006/techprogram/P63196.htm

6. Cole G., Coleman N., Soilleux E. HCV and HIV binding lectin, DC-SIGNR, is expressed at all stages of HCV induced liver disease // J. Clin. Pathology. – 2004. – V. 57. – P. 79-80.

7. Crowson A.N., Nuovo G., Ferri C., Magro C.M. The dermatopathologic manifestations of hepatitis C infection: A clinical, histological, and molecular assessment of 35 cases // Hum. Pathol. – 2003. – V. 34, N 6. – P. 573-579.

8. Sadler J.E. Thrombomodulin structure and function // Thromb. Haemost. – 1997. – V. 78, N 1. – P. 392-395.

9. Lip Y.H., Blann A. Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? // Cardiovascular Research. – 1997. – V. 34, N 2. – P. 255-265.

10. Константинова Н.А., Кирсанов А.Ю. Оценка криоглобулинов в сыворотке крови с учетом циркулирующих иммунных комплексов // Лабор. дело. – 1989. – № 11. – С. 62-65.

11. Hirano T., Ookubo K., Kashiwazaki K. et al. Vascular endothelial markers, von Willebrand factor and thrombomodulin index, are specifically elevated in type 2 diabetic patients with nephropathy: comparison of primary renal disease // Clin. Chim. Acta. – 2000. – V. 299, N 1-2. – P. 65-75.

12. Cacoub P., Ghillani P., Revelen R. et al. Anti-endothelial cell auto-antibodies in hepatitis C virus mixed cryoglobulinemia // J. Hepatol. – 1999. – V. 31, N 4. – P. 598-603.

13. Dammacco F., Sansonno D. Mixed cryoglobulinemia as a model of systemic vasculitis // Clin. Rev. Allergy Immunol. – 1997. – V. 15, N 1. – P. 97-119.

14. Balasubramanian A., Munshi N., Koziel J.M. et al. Structural proteins of Hepatitis C virus induce interleukin 8 production and apoptosis in human endothelial cells // J. Gen. Virol. – 2005. – V. 86. – P. 3291-3301.

15. Weiler H., Isermann B.H. Thrombomodulin // Thromb. Haemost. – 2003. – V. 1, N 7. – P. 1515-1524.

16. Яковлев В.М., Новиков А.И. Сосудистый эндотелий и хламидийная инфекция. – М.: Медицина, 2000. – 172 с.

17. Agnello V. The etiology and pathophysiology of mixed cryoglobulinemia secondary to hepatitis C virus infection // Springer Semin. Immunopathol. – 1997. – V. 19, N 1. – P. 111-129.

18. Kaplanski G., Farnarier C., Payan M.J. et al. Increased levels of soluble adhesion molecules in the serum of patients with hepatitis C. Correlation with cytokine concentrations and liver inflammation and fibrosis // Dig. Dis. Sci. – 1997. – V. 42, N 11. – P. 2277-2284.

19. Zeniya M., Fukata H., Toda G. Thrombomodulin expression of sinusoidal endothelial cells in chronic viral hepatitis // J. Gastroenterol. Hepatol. – 1995. – V. 10, Suppl. 1. – S. 77-80.

20. Takatori M., Iwabuchi S., Ro S. et al. Increased serum levels and sinusoidal expression of thrombomodulin in acute liver damage // Thromb. Res. – 1999. – V. 93, N 3. – P. 113-120.

THROMBOMODULIN AND VON WILLEBRAND FACTOR AS MARKERS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

M.A. Andreychyn, V.V. Kubatsky

SUMMARY. The article elucidates diagnostic value of thrombomodulin and von Willebrand factor as markers of endothelial dysfunction in patients with hepatitis C. Levels of above-mentioned markers reflect the activity of liver inflammation and correlate with others laboratory indices – alaninaminotransferase, thymol test, prothrombin index and crioglobulinemia.