

**В.В. Маврутенков**

## **КЛІНІКО-ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЛІЗОСОМНИХ ЦИСТЕЇНОВИХ КАТЕПСИНІВ ВІ ПРІНФЕКЦІЙНОМУ МОНОНУКЛЕОЗІ**

Дніпропетровська державна медична академія

*Наведено результати дослідження лізосомних цистеїнових катепсинів (ЛЦК) В і L при паралельному визначенні їх активності в сечі та сироватці крові пацієнтів з інфекційним мононуклеозом (ІМ), лакунарною ангіною, гострою респіраторно-вірусною інфекцією. Контрольну групу склали діти без ознак запального або пухлинного процесу. Виявлено підвищення активності катепсинів В і L як у сечі, так і в сироватці крові при ІМ порівняно з іншими групами. Отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що кількісне визначення активності ЛЦК, особливо катепсину В у сечі, є біохімічним маркером ІМ. Запропонована модель участі ЛЦК В і L в імунпатогенезі ІМ, де підвищення їх активності розглядається як механізм, спрямований на підтримку апоптозу інфікованих В-лімфоцитів через активацію Т-клітинної імунної відповіді за допомогою посилення реплікації вірусу.*

Інфекційний мононуклеоз – убіквітарне інфекційне захворювання, спричинене герпесвірусом Епштейна-Барр (ВЕБ). З моменту ідентифікації ВЕБ достатньо повно описані біологічні властивості збудника та імуногенез ІМ. З точки зору патогенезу, де клітиною-мішенню для ВЕБ є В-лімфоцит з фенотипом CD21<sup>+</sup>, ІМ – класична інфекція імунної системи [1, 2]. Це обумовлює клінічний поліморфізм ВЕБ-інфекції від субклінічних варіантів і аж до розвитку смертельно небезпечних уражень (апластичної анемії, лімфоми, менингоенцефаліту та ін.). Разом з тим, досі залишаються не з'ясованими біохімічні аспекти патогенезу ВЕБ-інфекції.

Одним з найважливіших регуляторних механізмів організму є система лізосомних цистеїнових катепсинів (ЛЦК), що належать до класу внутрішньоклітинних лізосомних протеаз [3]. Вирішальна роль ЛЦК полягає в їх універсальній участі в багатьох життєво важливих функціях: регуляції імунної відповіді та запалення, активації ремоделюван-

ня і деградації екстрацелюлярного матриксу, процесах пухлинної агресивності та апоптозу [4, 5]. Нині в людському організмі ідентифіковано 11 ЛЦК: L, V, S, K, W, F, O, B, X, H, C. Серед вище перерахованих протеаз найбільш вивченими з погляду структури і функції є ЛЦК В і L. При цьому відмітною характеристикою зазначених катепсинів є їх гістоспецифічність [6]. Враховуючи відсутність даних у доступній нам науковій літературі щодо функціонування системи ЛЦК при ВЕБ-інфекції, обґрунтоване дослідження зазначеної теми.

Мета роботи – дослідити клініко-патогенетичне значення ЛЦК В і L при ІМ за допомогою визначення їх активності в сечі і сироватці крові хворих.

### **Матеріали і методи**

Об'єктом дослідження були 139 осіб віком від 13 міс. до 45 років – середній вік становив (18,1±11,3) року. Серед обстежених було 76 (54,7 %) осіб чоловічої і 63 (45,3 %) – жіночої статі. Уся когорта спостережень була розділена на чотири групи залежно від клінічного статусу: 1-а – хворі на ІМ; 2-а – пацієнти з лакунарною ангіною (ЛА); 3-я – особи, госпіталізовані з приводу гострої респіраторно-вірусної інфекції (ГРВІ). Контрольну групу склали діти без ознак гнійно-деструктивного або пухлинного процесу, госпіталізовані у відділення планової хірургії з приводу «малих аномалій розвитку» (проби забирали до хірургічної травми або введення в наркоз).

Обґрунтування клінічних діагнозів у дітей обов'язково відповідало національним «Протоколам діагностики і лікування інфекційних захворювань у дітей» [7]. У пацієнтів старше 18 років клінічні діагнози верифікували відповідно з рекомендаціями Ж.І. Возіанової і співавт. (2001) [8]. З дослідження були виключені всі особи з ВІЛ-інфекцією, неопластичними, імунопатологічними і хронічними інфекційними захворюваннями. Летальних вислідів у всій когорті спостереження в жодному випадку не зареєстровано.

Аналіз наявності ЛЦК В і L у сечі та сироватці крові здійснювали шляхом визначення їх активності відповідно до протоколів досліджень [9, 10].

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Активність катепсину В виражали в мікромолях р-нітроаніліну за 1 хв на 1 мг білка  $\times 10^{-2}$ . Активність катепсину L виражали в умовних одиницях (ум. од.) на 1 мг білка згідно з інтенсивністю абсорбції при довжині хвилі 366 нм за 1 хв  $\times 10^{-2}$ . Вміст загальної кількості білка визначали за методом Бредфорд.

Біохімічна частина роботи виконана на кафедрі експериментальної фізики Дніпропетровського національного університету під керівництвом проф., д.б.н. В.І. Чорної. У методичному аспекті вивчення показників активності ЛЦК В і L у сироватці крові й сечі проводили паралельно в один день. При цьому у частини пацієнтів активність ЛЦК В і L визначали в динаміці захворювання, звичайно на 7-10-й день стаціонарного лікування.

Математичну обробку матеріалу робили за допомогою пакетів програм статистичного аналізу *STATISTICA 5.0* і *Excel XP*. Перевірка розподілу отриманих кількісних показників за допомогою критеріїв Колмогорова-Смірнова і Шапіро-Уїлка дозволила в більшості випадків відхилити гіпотезу про нормальний закон розподілу ( $\max D = 0,34-0,51$ ,  $P < 0,01$ ;  $W = 0,24-0,45$ ,  $P < 0,001$ ). У зв'язку з цим, при статистичній обробці застосовувалися непараметричні методи аналізу: U-критерій Манна-Уїтні, критерій Хі-квадрат Пірсона ( $\chi^2$ ), а також непараметричний дисперсійний аналіз (критерій Краскела-Уоліса). Основні статистичні характеристики, що наводяться в таблицях, мають наступні значення: n – число спостережень; M – середнє арифметичне значення; m – помилка середнього значення; SD – стандартне відхилення; r – коефіцієнт рангової кореляції Спірмена. Критичне значення рівня значимості (P) приймалося за  $< 5\%$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

Гостра фаза недуги в кожній групі характеризувалася загальною тенденцією до появи ЛЦК В і L як у сечі, так і в сироватці крові (табл. 1).

Слід відзначити, що кореляційний аналіз не виявив залежності показників активності ЛЦК В і L у крові або сечі з віком і статтю ( $r = 0,02-0,09$ ,  $P > 0,05$ ), що дозволило знехтувати зазначеними ознаками. Разом з тим, у гострому періоді тільки в аналізах сечі у хворих на ІМ і ГРВІ виявлено достовірне, відповідно  $P < 0,0007$  ( $\chi^2$ ) і  $P < 0,03$  ( $\chi^2$ ), підвищення активності катепсину В порівняно з контролем. При цьому індивідуальний аналіз показав, що в осіб 2-ї групи з виявленою активністю ЛЦК В або L у сечі частішим був ускладнений перебіг ЛА.

Встановлені розбіжності в активності ЛЦК у сечі між пацієнтами 2-ї групи порівняно з хворими 1-ї і 3-ї груп зрозумілі, виходячи з етіології захворювань. Однак, незважаючи на виявлену при вірусних інфекціях загальну тенденцію, ІМ має суттєвішу активацію лізосомно-вакуолярного апарату клітин. Так, при ІМ підвищена активність не тільки катепсину В у сечі, але й катепсину L як у сечі, так і в сироватці крові ( $P < 0,02$ ). Крім того, середній рівень сечової екскреції катепсину В у пацієнтів з ІМ був у 1,9 разу вище, ніж при ГРВІ ( $P < 0,03$ ). Особливо слід звернути увагу на той факт, що при наступному обстеженні активність катепсину В у сечі при ІМ, як і раніше, залишалася достовірно вищою порівняно з нормою ( $P < 0,03$ ). При цьому в пацієнтів з ІМ повторний аналіз здійснювали на 5-7 днів пізніше (звичайно на 12-15-у добу від початку захворювання) на відміну від хворих на ЛА або ГРВІ.

Клінічна оцінка статусу хворих на ІМ показала, що у пацієнтів з підвищеною активністю ЛЦК В і L у сечі і/або сироватці крові захворювання виявлялося в типовій формі. Крім того, активність у сечі катепсину В визначалася тільки при середньотяжких і тяжких формах ІМ ( $r = 0,43$ ,  $P < 0,05$ ).

Таблиця 1

Динаміка активності ЛЦК В і L у сечі та сироватці крові в групах спостереження ( $M \pm m$ )

Група	n	Сеча		Сироватка крові	
		Катепсин В	Катепсин L	Катепсин В	Катепсин L
Контрольна	14	0	0,045 $\pm$ 0,019	0	0
1-а (ІМ)					
1-е дослідження	30	0,467 $\pm$ 0,125	0,173 $\pm$ 0,035	0,028 $\pm$ 0,020	0,018 $\pm$ 0,007
2-е дослідження	17	0,088 $\pm$ 0,040*	0,050 $\pm$ 0,020*	0,013 $\pm$ 0,013	0,001 $\pm$ 0,001*
2-а (ЛА)					
1-е дослідження	53	0,137 $\pm$ 0,049	0,134 $\pm$ 0,053	0	0,087 $\pm$ 0,042
2-е дослідження	18	0,077 $\pm$ 0,053	0,082 $\pm$ 0,037	0	0,006 $\pm$ 0,005*
3-я (ГРВІ)					
1-е дослідження	42	0,253 $\pm$ 0,088	0,134 $\pm$ 0,038	0,283 $\pm$ 0,146	0,025 $\pm$ 0,015
2-е дослідження	14	0,034 $\pm$ 0,024*	0,014 $\pm$ 0,008*	0,009 $\pm$ 0,009*	0,009 $\pm$ 0,009

Примітка. \* – суттєва різниця між дослідженнями в динаміці ( $P < 0,05-0,01$ ). Активність катепсину В виражали в мікромолях р-нітроаніліну за 1 хв на 1 мг білка  $\times 10^{-2}$ , активність катепсину L – в ум. од. на 1 мг білка.

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Слід відзначити, що серед пацієнтів, у яких в досліджуваних біологічних рідинах ЛЦК не було, частіше виявляли легкі форми ІМ або пацієнт перебував на ранній стадії реконвалесценції.

Виходячи з функціонального значення і клітинної локалізації, поява у крові і/або сечі внутрішньоклітинних ензимів, якими є ЛЦК, вказує на ушкодження як мембран субклітинних структур, так і цитоплазматичної стінки [6]. У зв'язку з цим виникає запитання, чому рівень ЛЦК В і L статистично суттєвий тільки в сечі, незважаючи на виявлену кореляцію між їхньою активністю у сироватці крові й сечі, що становить відповідно  $r = 0,25$  і  $r = 0,63$  ( $P < 0,05$ )? Це протиріччя пояснюється тим, що в сироватці крові є великий асортимент інгібіторів протеолізу (гаптоглобін,  $\alpha_1$ -інгібітор протеїназ,  $\alpha$ -антиплазмін,  $\alpha$ -макроглобулін та ін.), що зв'язують активні центри ферментів. При фільтрації через клубочковий апарат нирок, катепсини в силу своєї незначної молекулярної маси (у середньому 20-30 кД), на відміну від інгібіторів протеолізу, проникають у сечу [11]. Тому оцінка вмісту катепсинів за їх функціональною активністю не виявляла ЛЦК у сироватці крові. Крім цього, катепсин В має властивості як ендо-, так і екзопептидази, що також може сприяти значнішій екскреції в позаклітинні рідини [6, 12].

Біологічне значення феномена екстрацелюлярної екскреції ЛЦК у патогенезі ІМ не можна визначити однозначно. З одного боку, ЛЦК є активними учасниками формування адаптивного імунітету за допомогою деградації антигену і сприяють «дозріванню» молекул II класу HLA-системи (головної системи гістосумісності людини) [12]. Катепсини В і L, володіючи поліфункціональністю, активно взаємодіють на всіх стадіях процесу з молекулами HLA-системи, каталізуючи тим самим хід імунних реакцій. З іншого боку, на моделі реовірусної інфекції було показано, що катепсини В і L сприяють «роздяганню» вірусу при проникненні його у фібробласт, що в кінцевому підсумку призводило до посилення вірусної реплікації [13]. Вважається, що цитоліз інфікованих В-клітин обумовлений не ВЕБ, а впливом сенсibilізованих Т-кілерів ( $CD3^+8^+$ ), що взаємодіють тільки з молекулами I класу HLA-системи [14]. Однак, для повноцінного дозрівання специфічних  $CD3^+8^+$  є обов'язковим одержання додаткового сигналу від Т-хелперів ( $CD3^+4^+$ ) [15]. Екстраполюючи вищевказані факти, можна зробити висновки про те, що катепсини, маючи пермісивний ефект вірусної реплікації, одночасно підсилюють презентацію вірусних антигенів на молекулах I і II класу HLA-системи, що активує Т-клітини як з фе-

нотипом  $CD3^+8^+$ , так і з  $CD3^+4^+$ , сприяючи адекватній імунній відповіді.

Важливим моментом імунопатогенезу ВЕБ-інфекції є той факт, що В-лімфоцити, трансформовані вірусом, здатні самостійно «презентувати» антиген імунним Т-клітинам [16]. Разом з цим, у дослідженні не вдалося встановити залежності між виявленням ДНК ВЕБ у сироватці крові методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і активності ЛЦК В і L у крові і/або сечі. Хоча у цьому випадку не можна виключити вплив методичного підходу діагностики – якісне визначення ДНК ВЕБ методом ПЛР.

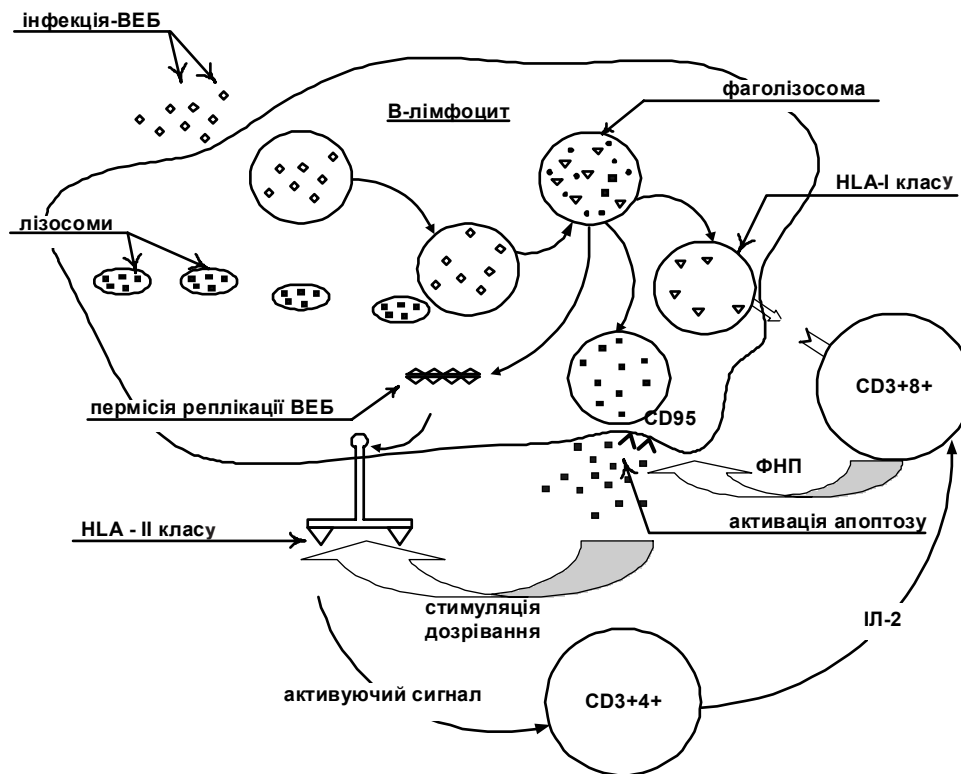
У патогенезі ВЕБ-інфекції є ще один аспект – блокування процесу апоптозу заражених ВЕБ В-лімфоцитів, що в принципі створює передумови для розвитку неоплазій [17, 18]. Є відомості, що в осіб, які перенесли ВЕБ-інфекцію у формі ІМ, надалі частіше реєстрували пухлинні недуги [3, 19]. За статистичними даними, за період 2000-2004 рр. було діагностовано близько 800 хворих на ІМ, коли у всіх випадках етіологія ВЕБ верифікована методами імуноферментного аналізу (ІФА) і ПЛР. Надалі в 3 (0,3 %) дітей, які перенесли ІМ, розвинулася онкогематологічна патологія (2 випадки лімфогранулематозу та 1 - апластичної анемії). Як зазначалося раніше, контроль над перебігом ВЕБ-інфекції здійснюється Т-клітинним імунітетом. При цьому одним з ініціюючих імунну відповідь цитокінів є фактор некрозу пухлини (ФНП), що крім всього іншого індукує апоптоз [20-22].

Кооперативні дослідження, проведені групою американських і європейських учених, показали, що катепсин В є основним медіатором, який опосередковує апоптозний ефект ФНП [23]. Таким чином, посилена активність ЛЦК В і L, що виникає в разі ІМ, є противагою лімфопроліферативному ефекту, обумовленому ВЕБ-інфекцією. Виходячи з вищезазначеного, можна припустити, що підвищення активності ЛЦК В і L при ІМ є компенсаторним механізмом, спрямованим на підтримку апоптозу через активацію Т-клітинної імунної відповіді за допомогою посилення реплікації вірусу в інфікованих В-лімфоцитах (мал. 1).

### Висновки

1. Кількісне визначення активності ЛЦК, особливо катепсину В у сечі, є біохімічним маркером ІМ, що спричиняється ВЕБ.

2. Наявність активності катепсину В може використовуватися і як критерій тяжкості недуги.



Мал. 1. Загальна схема участі ЛЦК у формуванні адаптивної Т-клітинної імунної відповіді: ФНП – фактор некрозу пухлини, CD3+8+ – кілери/супресори, CD3+4+ – хелпери/індуктори.

## Література

1. Фролов А.Ф. Персистенция вирусов (механизмы и клинико-эпидемиологические аспекты). – Винница: Винниц. мед. ун-т им. Н.И. Пирогова, 1995. – 233 с.
2. Cohen J.I. Epstein-Barr virus and the immune system // JAMA. – 1997. – V. 278, N 6. – P. 510-513.
3. Дингл Дж. Лизосомы. Методы исследования. – М.: Мир, 1980. – 342 с.
4. Чорна В.І., Какадій О.Л. Лізосомні цистеїнові протеїнази при злоякісному рості // Онкологія. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 84-89.
5. Turk B., Turk D., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers // Biochem. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1477. – P. 98-111.
6. Turk V., Turk B., Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities // The EMBO J. – 2001. – V. 20, N 17. – P. 4629-4633.
7. Наказ МОЗ України № 354 «Про затвердження Протоколів діагностики та лікування інфекційних хвороб у дітей» // Зб. нормат.-директивних документів з охорони здоров'я. – Київ, 2004. – № 42. – С. 89-122.
8. Возіанова Ж.І. Інфекційні і паразитарні хвороби: В 3-х т. – Київ: Здоров'я, 2001. – Т. 1. – 856 с.
9. Черная В.И. Катепсин L из опухоли мозга человека. Очистка и содержание // Укр. биохим. журн. – 1998. – Т. 70, № 5. – С. 97-103.
10. Черная В.И. Изучение активности катепсина В в опухолях головного мозга человека // Доп. НАН України (математика, природознавство, технічні науки). – 1999. – № 2. – С. 172-177.
11. Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения / Под ред. К.Н. Веремеенко, В.Н. Коваленко. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
12. Wolters P.J., Chapman H.A. Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease // Respiratory Research. – 2000. – V. 1, N 3. – P. 170-177.
13. Ebert D.H., Deussing J., Peters C., Dermody T.S. Cathepsin L and B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277, N 27. – P. 24609-24617.
14. Schooley R.T. Epstein-Barr Virus (Infectious Mononucleosis) // Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases / Ed. by G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – 4<sup>th</sup> ed. – New York: Churchill Livingstone, 1995. – V. 2. – P. 1364-1377.
15. Дранник Г.Н. Специфический приобретенный (адаптивный) иммунитет: созревание Т- и В-лимфоцитов, индук-

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ция толерантності, характеристика Т-лімфоцитів // Сучасні інфекції. – 2000. – № 3. – С. 96-108.

16. Брондз Б.Д. Т-лімфоцити та їх рецептори в іммунологічному розпізнаванні. – М.: Наука, 1987. – 471 с.

17. Савцова З.Д., Гриневич Ю.А., Менек Т.А. та др. Вирусні інфекції, асоційовані з онкологічними захворюваннями людини // Сучасні інфекції. – 2000. – № 3. – С. 70-89.

18. Волоха А.П., Чернишова Л.І. Епштейн-Барр вірусна інфекція у дітей // Там само. – 2003. – № 4. – С. 79-93.

19. Macsween K.F., Crawford D.H. Epstein-Barr virus – recent advance // The Lancet Infect. Dis. – 2003. – V. 3. – P. 131-140.

20. Кетлінський С.А., Симбірцев А.С., Вороб'єв А.А. Ендogenous іммуномодулятори. – СПб: Гиппократ, 1992. – 256 с.

21. Ильинская И.Ф. Апоптоз, апоцитоз та їх роль в іммуному відпові (аналітичний огляд) // Лабор. діагностика. – 2002. – № 3. – С. 66-72.

22. Дранник Г.Н. Клинічна іммунологія та алергологія. – М.: ООО «Мед. інформ. агентство», 2003. – 604 с.

23. Foghsgaard L., Wissing D., Mauch D. et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis factor // J. Cell Biology. – 2001. – V. 153, N 5. – P. 999-1010.

## CLINICAL-PATHOGENETIC RELEVANCE OF LYSOSOMAL CYSTEINE CATHEPSINS B AND L AT INFECTIVE MONONUCLEOSIS

V.V. Mavrutenkov

**SUMMARY.** The results of research of urine and serum lysosomal cysteine cathepsin (LCC) B and L activity in patients with infective mononucleosis (IM), lacunar angina (LA), acute viral respiratory infection (AVRI) and healthy children without any signs of inflammation or tumor process are presented in the article. The reliably increased activity of both LCC B and L in urine as well as in serum was established in patients with IM but not at LA, AVRI and in healthy children. We conclude that quantitative determination of LCC B and L activity, especially in urine, is a biochemical marker of IM. We assume that LCC B and L participate in immunopathogenesis of IM. The offered model is considered as a mechanism directed on the maintenance of the infected B-cells apoptosis via activation of T-cell immune response by means of virus replication strengthening.

© Шевченко Л.Ю., Покровська Т.В., Бельдїй В.І., Алексанян Т.І., 2005  
УДК 616.988.55-053.8-07

**Л.Ю. Шевченко, Т.В. Покровська, В.І. Бельдїй, Т.І. Алексанян**

## ОСОБЛИВОСТІ КЛІНІЧНОГО ПЕРЕБІГУ ІНФЕКЦІЙНОГО МОНОНУКЛЕОЗУ В ДОРΟΣЛИХ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,  
Обласна клінічна інфекційна лікарня

*Проаналізовано клінічні форми інфекційного мононуклеозу (ІМ) у різних вікових групах хворих. Встановлено, що клінічними особливостями ІМ у дорослих є: лімфаденопатія, яка випереджає розвиток гострого тонзиліту на 3-4 дні та буває значно рідше, слабше ураження носоглотки, переважні прояви катарального тонзиліту, тривала температурна реакція, нерідко немає спленомегалії. На фоні помірного лейкоцитозу, а нерідко і лейкопенії, поява віроцитів відбувається повільніше, не раніше 2-3-го тижня. Атиповий перебіг і відсутність віроцитозу на 1-му тижні недуги ускладнюють діагностику ІМ на ранніх стадіях хвороби.*

Інфекційний мононуклеоз спричиняється γ-герпесвірусом 4-го типу – вірусом Епштейна-Барр (ВЕБ),

який вперше виділений з клітин лімфоми Беркета в 1964 р. Вірус містить дві молекули ДНК і має властивість, як і інші віруси цієї групи, життєво персистувати в організмі людини [1, 2]. ВЕБ інфікує людину, проникаючи через інтактні епітеліальні шари шляхом трансцитозу в підлеглу лімфоїдну тканину мигдаликів, а саме В-лімфоцити [3]. Проникнення ВЕБ у В-лімфоцити відбувається через рецептор цих клітин CD21 до C3d-компоненту комплекта. Після інфікування число уражених клітин збільшується шляхом вірус-залежної клітинної проліферації. Інфіковані В-лімфоцити можуть значний час перебувати в тонзиллярних криптах, що дозволяє вірусу виділятися у довкілля зі слиною. З інфікованими клітинами ВЕБ поширюється по іншим лімфоїдним тканинам і периферичній крові. Дозрівання В-лімфоцитів у плазма-