

М.С. Суременко, О.П. Шевченко

КЛІНІКО-ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ГОСТРИХ І ХРОНІЧНИХ ВІРУСНИХ ГЕПАТИТАХ І ЦИРОЗАХ ПЕЧІНКИ

Дніпропетровська державна медична академія

Обстежено 185 хворих з гострими і хронічними вірусними гепатитами (ВГ), цирозом печінки (ЦП), механічною жовтяницею (МЖ). Виявлено зміни активності матриксних металопротеїназ (ММП), рівня гіалуронової кислоти (ГК) та фібронектину (ФН) у різних групах хворих залежно від етіології, клінічного перебігу та активності процесу, що може стати допоміжним критерієм диференційної діагностики.

Ключові слова: вірусні гепатити, фібронектин, ММП-2, ММП-9, гіалуронова кислота.

Питання прогнозу перебігу ВГ, диференційної діагностики гострих і ХВГ, ЦП та МЖ, незважаючи на значні досягнення сучасної науки, залишаються недостатньо вирішеними. Патогенетична терапія хворих на ВГ, ХВГ і ЦП, з урахуванням активності протеолітичних процесів, недостатньо повно вивчена і обґрунтована [1, 2].

Для діагностики стадії фіброзу так званим «золотим стандартом» вважається голкова пункційна біопсія печінки. Проте вона є інвазивною процедурою, має ряд протипоказань, можливих ускладнень, потребує високої кваліфікації лікаря-морфолога і т. ін. [3]. Тому багатьма авторами пропонуються різні біохімічні тести і шкали для визначення стадій фіброзу печінки з порівняльною характеристикою біохімічних показників і морфологічних даних у печінці [4-6]. До таких маркерів деякі автори відносять ММП, ГК, ФН [7-13]. У вітчизняній літературі ми не знайшли праць, де б обговорювалось дослідження активності протеолітичних процесів при ВГ, ХВГ, ЦП на підставі вивчення активності ММП та компонентів екстрацелюлярного матриксу як їх субстратів, а саме ГК і ФН.

Пацієнти і методи

Обстежено 185 хворих віком від 18 до 70 років. Серед них: хворих на гострий ВГ – 60, а саме: на ГГА – 21, на ГГВ – 39; хворих на ХВГ – 66, з них на ХГВ – 10,

на ХГС – 40, на мікст-гепатити (ХГ В+С) – 16; хворих на цироз печінки вірусного генезу – 47 (10 з ЦП класу В та 37 – класу С за Чайлд-Пью) та 12 хворих на механічну жовтяницю. Групу порівняння (контрольну) становили 30 здорових донорів крові.

У процесі роботи використовували такі методи дослідження: клініко-епідеміологічні, біохімічні, спеціальні біохімічні з визначенням у сироватці крові рівня ГК за методом Голда, вмісту плазматичного ФН та його фрагментів Дот-аналізом (твердофазним імуноферментним аналізом – тіФА) та імуноблотом, активності желатинази, а саме, матриксних металопротеїназ ММП-2 та ММП-9 методом прямої желатин-зимографії з попереднім вертикальним електрофорезом, серологічні та молекулярно-генетичні дослідження методами ІФА і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у сироватці крові для визначення маркерів вірусів гепатитів А, В, С, сонографічні (УЗД органів черевної порожнини) та, за потреби, ендоскопічні (фіброезофагогастроуденоскопію – ФЕГДС та ендоскопічну ретроградну холангіопанкреатографію – ЕРХПГ). Діагноз встановлено на підставі клініко-анамнестичних даних, підтверджено серологічно, а також біохімічними методами дослідження печінкового комплексу, білкових фракцій сироватки крові, УЗД черевної порожнини. Діагноз ЦП встановлювали за функціональним станом по Чайлд-Пью. Статистична обробка результатів здійснювалася з використанням параметричних і непараметричних методів біостатистики, реалізованих у пакетах ліцензійних програм *Microsoft Excel 2003* та *Statistica v6.1*.

Результати досліджень та їх обговорення

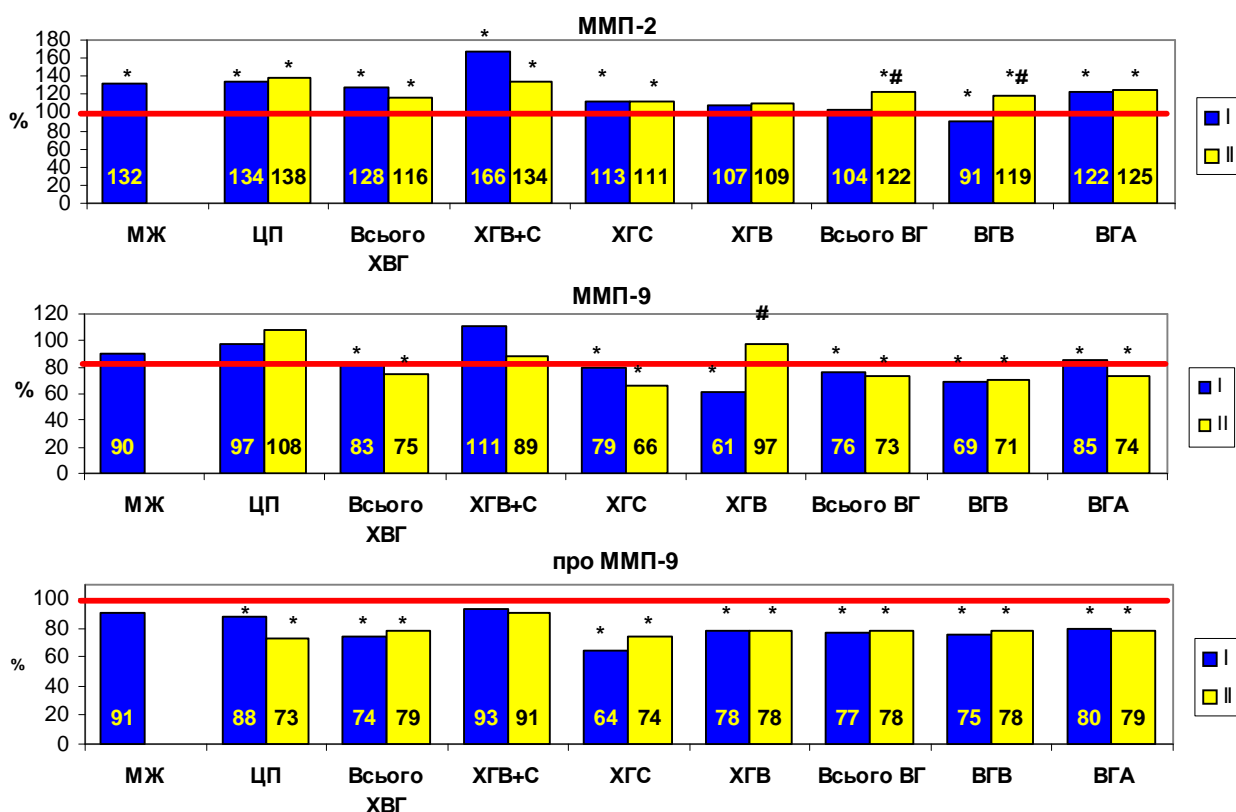
Під час дослідження було виявлено зміни активності желатиназ у всіх групах хворих. Так, желатиназа А (ММП-2) визначалась тільки в активній формі, а желатиназа В (ММП-9) – як в активній, так і в неактивній формі, у вигляді зимогенів (про-ММП-9). Активність ММП у контрольній групі (серед здорових людей) умовно була прийнята за 100 %.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Активність желатиназ змінювалась у значних межах, але майже у всіх групах хворих спостерігалось достовірне підвищення активності ММП-2 ($p < 0,05-0,001$) порівняно з контрольною групою, що було висвітлено у наших попередніх роботах [14]. Найбільші відмінності відзначались при цирозі печінки і хронічних мікст-гепатитах (мал. 1), причому в окремих випадках показники активності ММП в 2-2,8 разу перевищували норму. Це може вказувати на більшу активацію саме ММП-2

при цих нозологіях. На відміну від ММП-2, рівень активності про-ММП-9 і активної форми ММП-9 в більшості груп дослідження був значно меншим ($p < 0,05-0,001$) порівняно з контролем.

Серед хворих на ВГ при різних етіологічних чинниках у стадії ранньої реконвалесценції рівень ММП-9 не відновлювався до значень контрольної групи ($p < 0,01-0,001$), а рівень ММП-2 залишався високим ($p < 0,05-0,01$) (мал. 1).



Мал. 1. Динаміка активності протеолітичних ферментів (ММП-2 та ММП-9) в обстежених хворих на ВГ, ХВГ, ЦП, МЖ, де I – перше дослідження, II – друге дослідження, * - $p < 0,05-0,001$ порівняно із здоровими людьми; # - $p < 0,05-0,001$ у динаміці.

У хворих на ХВГ динаміка ММП залежала від етіологічного чинника: при ХГС спостерігались такі ж закономірності, як при ВГ, при ХГВ – активні форми желатиназ не відрізнялись від контролю ($p > 0,05$), а при мікст-гепатитах рівень ММП-2 залишався суттєво збільшеним порівняно з контролем – $(133,7 \pm 16,9) \%$ ($p < 0,001$) при статистично незміненому рівні ММП-9 ($p > 0,05$ у динаміці і щодо контролю).

Більш показовим виявився аналіз динаміки співвідношення ММП-2/ММП-9 у всіх групах хворих (табл. 1).

На I етапі дослідження в усіх групах хворих відзначалось достовірне ($p < 0,05-0,001$) збільшення співвідношення активних форм желатиназ порівняно з групою здорових донорів, прийнятою за 1. У динаміці досліджень серед хворих на гострі гепатити А і В спостерігалась тенденція ($p > 0,05$) до подальшого збільшення цього співвідношення. При ХВГ динаміка показника ММП-2/ММП-9 була іншою. Зокрема, при ХГС і мікст-гепатитах співвідношення практично не змінювалось і залишалось суттєво більшим за норму. При ХГВ цей показник достовірно зменшився в 1,7 разу

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1
Динаміка співвідношення ММП-2/ММП-9 у різних групах хворих (M±m)

| Група | I дослідження | II дослідження |
|---------------------|------------------------|------------------------|
| ГА | 1,58±0,13 ¹ | 1,85±0,17 ¹ |
| ГВ | 1,68±0,21 ¹ | 1,97±0,18 ¹ |
| Всього ВГ | 1,64±0,13 ¹ | 1,93±0,13 ¹ |
| ХГВ | 2,32±0,38 ¹ | 1,36±0,25 ² |
| ХГС | 2,06±0,31 ¹ | 2,18±0,27 ¹ |
| ХГ В+С | 1,74±0,32 ¹ | 1,68±0,25 ¹ |
| Всього ХВГ | 2,03±0,21 ¹ | 1,96±0,19 ¹ |
| ЦП | 1,86±0,23 ¹ | 1,78±0,17 ¹ |
| Механічна жовтяниця | 1,81±0,29 ¹ | - |

Примітки: ¹ – p<0,05-0,001 порівняно із здоровими людьми; ² – p<0,05 в динаміці порівняно з періодом розпалу.

(p<0,05), наблизившись у II дослідженні до показника здорових осіб (p>0,05). При ЦП співвідношення ММП-2/ММП-9 також не зазнало суттєвих змін у динаміці і залишилось високим (p<0,001 з контролем). При МЖ цей показник на висоті клінічних проявів захворювання становив у середньому 1,81±0,29. Між вмістом ММП-2 та ММП-9 при ВГ та ХВГ з'являється прямий кореляційний зв'язок (r=0,5 та 0,35, p<0,05).

Дослідження вмісту гіалуронової кислоти виявило достовірне підвищення її рівня у хворих всіх груп порівняно зі здоровими людьми (p<0,01-0,001) (табл. 2).

Таблиця 2
Рівень ГК у різних групах хворих, мкг/мл (M±m)

| Група | I дослідження | II дослідження |
|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| ВГ (n=64) | 2,16±0,11 ^{1,3} | 2,58±0,12 ^{1,2,3} |
| ХВГ (n=66) | 2,25±0,10 ¹ | 2,50±0,08 ^{1,2,3} |
| ЦП (n=45) | 2,60±0,21 ¹ | 3,30±0,21 ^{1,2} |
| Механічна жовтяниця (n=12) | 1,97±0,13 ^{1,3} | - |
| Здорові люди (n=22) | 1,24±0,04 | - |

Примітки: ¹ – порівняно із здоровими людьми (p<0,001); ² – в динаміці з періодом розпалу (p<0,05); ³ – з відповідним показником у групі хворих на ЦП (p<0,05-0,001).

У здорових людей концентрація ГК становила (1,24±0,04) мкг/мл. При I дослідженні концентрація ГК у хворих на ВГ визначалась в межах (2,16±0,11) мкг/мл, ХВГ – (2,25±0,10) мкг/мл, ЦП – (2,60±0,21) мкг/мл, на механічну жовтяницю – (1,97±0,13) мкг/мл (p<0,001 порівняно із здоро-

вими людьми). У II дослідженні концентрація ГК становила у хворих на ВГ (2,58±0,12) мкг/мл, ХВГ – (2,50±0,08) мкг/мл, ЦП – (3,30±0,21) мкг/мл. У деяких хворих з декомпенсованим цирозом печінки рівень ГК зростав у 3 рази на висоті клінічних проявів, що може вказувати на високий рівень фібротичних процесів. У таких хворих з ЦП класу С за Чайлд-Пью доброякісного перебігу концентрація ГК була (4,21±0,35) мкг/мл при вступі у стаціонар та (2,90±0,44) мкг/мл при виписці, мали місце достовірні розбіжності у динаміці рівня ГК та у порівнянні зі здоровими людьми (p<0,01). Загалом концентрація ГК у хворих на ЦП (класу В та С) становила (2,60±0,21) та (3,30±0,21) мкг/мл у I і II дослідженні відповідно. У 3 хворих з декомпенсованим ЦП класу С за Чайлд-Пью з термінальною стадією відмічалась тенденція до зниження рівня ГК у динаміці при вступі в стаціонар та у кінцевій стадії ЦП і становила від 0,92 до 0,34 мкг/мл відповідно, тобто була значно нижче за нормальні значення, що свідчить про зниження синтезу усіх білків в організмі у термінальній стадії.

Рівень ГК у всіх групах хворих після комплексного патогенетичного лікування з використанням глутаргіну достовірно підвищувався, в тому числі при ВГ – в середньому на (0,42±0,16) мкг/мл (p<0,01), при ХВГ – на (0,25±0,12) мкг/мл (p<0,05), при ЦП – на (0,70±0,30) мкг/мл (p<0,05).

Концентрація ГК, як при ВГ, так й при ХВГ, залежала від етіологічного чинника, зокрема початковий рівень ГК при ГА становив (2,53±0,16) проти (1,98±0,14) мкг/мл при ГВ (p<0,05). При ХГВ середня концентрація ГК дорівнювала (2,73±0,08) проти (2,12±0,14) мкг/мл при ХГС і (2,15±0,17) – при мікст-гепатитах (p<0,05).

Окрім етіологічного розподілу, вивчались розбіжності в групах за ступенем тяжкості і активності процесу. Так, як указувалось у наших попередніх роботах [15], при хронічних гепатитах з мінімальним ступенем активності підвищення показника ГК спостерігалось у періоді реконвалесценції до (1,90±0,32) мкг/мл. При хронічних гепатитах з вираженим ступенем активності та цирозах печінки відмічались більш високі показники ГК на початку загострення (2,20±0,35 мкг/мл), але вони не нормалізувались у періоді ранньої реконвалесценції (підвищення від 1,3 до 1,5 разу). В цілому достовірних відмінностей між підгрупами у рівнях ГК не виявлено (p>0,05). Проте, суттєва динаміка між I і II дослідженням відмічалась при тяжкій формі ВГ і при вираженому ступеню активності ХВГ (p<0,05).

Отримані дані свідчать, що зміни рівня ГК у хворих на ВГ, ХВГ та ЦП залежать від клінічного перебігу. При хронічних ураженнях печінки, особливо при виразному ступеню активності, відмічаються більш суттєві зміни рівня ГК порівняно з гострими вірусними гепатитами та контрольною групою (до 1,5 разу). Як свідчать результати моніторингу рівня ГК, при стиханні активності процесу у хворих на ХВГ і ЦП відмічалось його підвищення в сироватці крові. Проведений кореляційний аналіз у хворих з ЦП показав пряму залежність тяжкості стану хворих від виразності симптомів загальної інтоксикації – коефіцієнт кореляції (r) дорівнював 0,57 ($p < 0,01$), наявності скарг на виражену слабкість ($r = 0,36$, $p < 0,05$) та тривалу лихоманку ($r = 0,51$, $p < 0,01$), ступеня гепатомегалії ($r = 0,39$, $p < 0,05$), наявності ознак цирозу печінки та гемолітичної анемії ($r = 0,37$, $p < 0,05$). Виявляється пряма кореляція між вмістом ММП-2 та ГК при цирозах печінки ($r = 0,76$, $p < 0,05$).

При визначенні концентрації ФН, що частково було розкрито у наших попередніх роботах [16], вміст його у хворих на ХВГ в період загострення становив ($322,8 \pm 24,4$) мкг/мл, у всіх хворих на ЦП (класів В та С) – статистично значимо знижувався і становив ($229,4 \pm 15,5$) мкг/мл порівняно зі здоровими людьми – ($328,2 \pm 16,9$) мкг/мл ($p < 0,001$); при ЦП класу С вміст ФН становив ($213,4 \pm 17,6$) мкг/мл, що відображує більший ступінь інтоксикації, ніж у хворих на ЦП класу В. При термінальній стадії ЦП вміст ФН був нижче 100 мкг/мл, що значно менше, ніж у середньому при ЦП доброякісного перебігу – ($213,4 \pm 17,6$) мкг/мл ($p < 0,05$) і, таким чином, свідчить про несприятливий прогноз.

Концентрація ФН відрізнялась у групах хворих залежно від класу ЦП і найбільше зниження даного показника спостерігалось при тяжкому перебігу. У термінальній стадії ЦП класу С за Чайлд-Пью вміст ФН був значно нижчим, ніж при ЦП доброякісного перебігу, і становив 54,37 мкг/мл. Зниження показника корелює з рівнем летальності ($r = -0,47$; $p < 0,05$). Не було виявлено достовірної кореляції між рівнем активності ММП та концентрацією ФН.

Таким чином, дослідження активності протеолітичних процесів при ВГ, ХВГ, ЦП на підставі вивчення активності ММП та таких компонентів екстрацелюлярного матриксу, як ГК і ФН, свідчать про можливість їх використання як доступних і швидких малоінвазивних біохімічних показників, придатних для диференційної діагностики ВГ, ХВГ, ЦП та МЖ, і доцільність застосування для визна-

чення ефективності патогенетичної терапії означених станів.

Висновки

1. У хворих на ВГ при різних етіологічних чинниках у стадії ранньої реконвалесценції та у хворих на ХВГ при стиханні загострення рівень ММП-9 не відновлюється до значень контрольної групи, а рівень ММП-2 залишається високим. При ХГ В+С рівень ММП-2 залишався суттєво збільшеним порівняно з контролем ($p < 0,001$) при статистично незміненому рівні ММП-9 ($p > 0,05$ в динаміці і порівняно з контролем). Співвідношення ММП-2/ММП-9 у обстежених хворих при ХГС і мікст-гепатитах практично не змінювалось. При ХГВ цей показник достовірно зменшився в 1,7 разу ($p < 0,05$), наблизившись у II дослідженні до показника здорових осіб ($p > 0,05$). При цирозі печінки співвідношення ММП-2/ММП-9 також не зазнало суттєвих змін у динаміці і залишилось високим ($p < 0,001$ з контролем). При МЖ цей показник на висоті клінічних проявів захворювання становив в середньому $1,81 \pm 0,29$.

2. Доведено, що при гострих ВГ, ХВГ і ЦП у сироватці крові достовірно підвищується вміст ГК ($p < 0,001$). Ступінь підвищення залежить від етіології гепатиту, тяжкості та клінічної форми захворювання. Рівень ГК та активність ММП при ЦП значно вищий, ніж при гострих ($p < 0,001$) та хронічних ВГ, як в активну фазу ($p < 0,005$), так і в період відносної клініко-лабораторної ремісії ($p < 0,05$). Виявляється пряма кореляція між вмістом ММП-2 та ГК при ЦП ($r = 0,76$, $p < 0,05$). Рівень ГК у сироватці крові достовірно підвищується при МЖ, але нижче, ніж при ВГ, ХВГ, та ЦП, що може бути використано як допоміжний критерій диференційної діагностики МЖ і жовтяниць вірусного генезу ($p < 0,05-0,001$).

3. Вміст ФН у крові в період загострення статистично значимо знижується у хворих на ЦП ($p < 0,001$) і становить у хворих на ХВГ ($322,8 \pm 24,4$) мкг/мл, у хворих на ЦП (класів В та С) – ($229,4 \pm 15,5$) та у хворих на ЦП класу С – ($213,4 \pm 17,6$) мкг/мл. Найбільш чітко це спостерігалось при ЦП ($p < 0,001$ порівняно із здоровими людьми). Це може бути обумовлене його надмірним споживанням як опсоніну та відображати недостатню синтетичну функцію гепатоцитів.

4. При термінальній стадії ЦП вміст ГК та ФН значно нижчий, ніж при тяжких формах ВГ доброякісного перебігу ($p < 0,001$), та є показником несприятливого прогнозу. Зниження показника корелює з рівнем летальності ($r = -0,47$; $p < 0,05$).

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Література

1. Андрейчин М.А. Вірусні гепатити (лекція). – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 51 с.
2. Возіанова Ж.І., Корчинський М.С. Хронічні вірусні гепатити // Журн. практ. лікаря. – 2002. – № 6. – С. 7-14.
3. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection / Regev A. et al. // Am. J. Gastroenterol. – 2002. – Vol. 97. – P. 2614-2618.
4. Пинцани Массимо. Еволюція фіброза печені: от гепатита к циррозу // Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колоректол. – 2002. – № 5. – С. 4-9.
5. Громашевська Л.Л., Пінський Л.Л. Порушення метаболічних процесів у позаклітинному матриксі, їх регуляції при розвитку фіброзу печінки: маркери його в сироватці крові хворих на хронічний гепатит С // Лабор. діагностика. – 2004. – №4. – С. 3-10.
6. Мороз Л.В. Морфобіохімічні паралелі при хронічних вірусних гепатитах // Вісник морфології. – 2001. – Т. 7, № 2. – С. 233-235.
7. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of α -interferon therapy / Guechot J., Loria A., Serfaty L. et al. // J. Hepatol. – 1995. – Vol. 22. – P. 22.
8. Automated assays of serum markers of liver fibrosis predict histologic hepatic fibrosis / Rosenberg W., Burt A., Becka M. et al. // Hepatology. – 2000. – N 32. – P. 183.
9. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study / Imbert-Bismut F., Ratziu V., Pieroni L. et al. // Lancet. – 2001. – Vol. 357. – P. 1069-1075.
10. Pilette C. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis is semi-quantitative scores – comparison with serum markers // J. Hepatology. – 1998. – Vol. 28. – P. 439-446.
11. Bataller R., Brenner D.A. Liver fibrosis // J. Clin. Invest. – 2005. – Vol. 115, N 2. – P. 209-218.
12. Шостакович-Корецька Л.Р., Хайкін П.Л., Маслак Г.С. Вільний та зв'язаний фібронектин в імунопатогенезі HBV та HCV-інфекції // Мед. перспективи. – 2002. – № 1. – С. 109-112.

13. Соболева Г.М., Сухих Г.Т. Семейство матриксных металлопротеиназ: общая характеристика и физиологическая роль // Акушерство и гинекология. – 2007. – № 1. – С. 5-8.

14. Активність матриксних металопротеїназ при гострих і хронічних вірусних гепатитах та циррозах печінки / Шевченко О.П., Суремченко М.С., Бразалук О.З., Стекльнова Н.І. // Гастроентерологія: міжвід. зб. – Дніпропетровськ, 2009. – Вип. 41. – С. 195-200.

15. Шевченко О.П. Рівень гіалуронової кислоти у сироватці крові у хворих на вірусні гепатити та їх наслідки // Гастроентерологія: міжвід. зб. – Дніпропетровськ, 2010. – Вип. 44. – С. 414-420.

16. Зв'язок активності протеолітичних ферментів MMP-2 та MMP-9 з рівнем фібронектину та його фрагментованістю у хворих на цироз печінки / Шевченко О.П., Суремченко М.С., Кулініч А.О., Шевцова А.І. // Сучасні аспекти військової медицини: Зб. наук. праць Головного військово-медичного клінічного центру «ГВКГ» МО України. – К., 2010. – Вип. 16. – С. 493-498.

CLINICO-DIAGNOSTIC VALUE OF ACTIVITY OF PROTEOLYSIS PROCESSES AT ACUTE AND CHRONIC VIRAL HEPATITIS AND LIVER CIRRHOSIS

M.S. Suremenko, O.P. Shevchenko

SUMMARY. There were inspected 185 patients with acute and chronic viral hepatitis, liver cirrhosis and mechanical icterus. The changes of activity of MMP-2 and MMP-9, level of serum hyaluronic acid and fibronectin were found in the different groups of patients depending on etiology, clinical motion and activity which can become the auxiliary criterion of differential diagnostics.

Key words: viral hepatitis, Fibronectin, MMP-2, MMP-9, hyaluronan.

Отримано 19.01.2011 р.