

**Ю.В. Юзько, Н.Б. Волошина, Т.В. Алексеенко, Н.Г. Савченко,
Т.А. Короленко**

ЛИЗОСОМНЫЕ ФЕРМЕНТЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С И ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

ГОУ ВПО Новосибирская государственная медицинская академия

Цель работы – исследовать зависимость активности лизосомных ферментов у больных вирусным гепатитом С и циррозом печени от биохимической активности воспалительного процесса и стадии заболевания; сравнить степень выраженности изменений ферментов лизосом, относящихся преимущественно к гепатоцитам или печеночным макрофагам. У больных хроническим вирусным гепатитом С обнаружена крайне низкая активность β -галактозидазы, не зависящая от биохимической активности воспалительного процесса в печени; определена прямая достоверная корреляционная зависимость активности хитотриозидазы и металлопротеиназ (ММП) второго и седьмого типа (ММП-2, -7) сыворотки крови у пациентов и доноров, однако достоверных различий их активности у больных с активным и неактивным гепатитом не отмечено. У больных циррозом печени в исходе вирусного гепатита С обнаружено достоверное повышение активности хитотриозидазы и ММП, не зависящее от биохимической активности процесса, что может рассматриваться в качестве одного из неинвазивных методов диагностики цирроза печени. Представляется важным дальнейшее исследование активности ММП, а также их ингибиторов – тканевого ингибитора металлопротеиназ первого и второго типа (TIMP-1, -2), позволяющее на ранних сроках выявить развитие соединительной ткани в печени. Обнаруженное нами увеличение активности ММП и хитотриозидазы у больных циррозом печени требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: вирусный гепатит С, цирроз печени, металлопротеиназы, хитотриозидаза

Наиболее частой причиной развития хронических гепатитов является поражение вирусом гепатита С (ВГС). Почти у 80% пациентов, инфицированных данным вирусом, заболевание приобретает хроническое течение с формированием у 25% из них на протяжении от 10 до 20 лет цирроза печени с возможным развитием гепатоцеллюлярной карциномы. В некоторых случаях вирусное поражение печени протекает латентно, без каких-либо клинических проявлений или «маскируется» под другие заболевания, однако даже латентное течение хронического гепатита может стать причиной развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

В связи с этим, в последние годы значительное внимание уделено поиску сывороточных маркеров развития фиброза у больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) [5, 6]. Среди сывороточных маркеров фиброза рассматриваются матриксные металлопротеазы-1, -2, -9 и их эндогенные ингибиторы – тканевые ингибиторы металлопротеаз (TIMP-1, TIMP-2), коллаген I, IV и VI типов, гиалуроновая кислота, лизосомные

ферменты сыворотки крови [5, 7]. Известно, что реакция лизосомального аппарата клеток печени на действие различных повреждающих факторов сопровождается лабильзацией мембран лизосом, усилением образования вторичных лизосом, повышенной секрецией лизосомных ферментов [4]. В паренхиматозных и непаренхиматозных клетках печени интактных крыс обнаружены различия активности ряда лизосомных ферментов, позволяющие вычленивать клеточное происхождение ферментов сыворотки крови. Так, для макрофагов показана обогащенность такими лизосомными ферментами, как β -N-ацетилглюкозаминидаза, катепсин D, катепсин B, хитотриозидаза [3, 4], в гепатоцитах отмечена высокая удельная активность катепсина L и др. [3, 4]. Активность матриксного фермента лизосом β -галактозидазы несколько выше в гепатоцитах по сравнению с макрофагами [16].

К настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие, что в основе изменений функциональных проб печени при HCV-инфекции лежит эффекторная функция макрофагов и,

в частности, клеток Купфера. Эти клетки секретируют в среду цитокины, лизосомные ферменты и др., которые обладают способностью изменять резистентность организма к инфекции, опухолям, травме и другим патогенным воздействиям [10, 17].

Цель работы — исследовать зависимость активности лизосомных ферментов у больных вирусным гепатитом С и циррозом печени от биохимической активности воспалительного процесса и стадии заболевания; сравнить степень выраженности изменений ферментов лизосом, относящихся преимущественно к гепатоцитам или печеночным макрофагам.

Материалы и методы

Исследование произведено у 59 пациентов с HCV-инфекцией, средний возраст которых составил $41,4 \pm 13,5$ лет (37 мужчин и 22 женщины) и 9 больных циррозом печени (4 женщины и 5 мужчин), а также 20 практически здоровых постоянных доноров. У всех пациентов получено письменное информированное согласие на проведение обследования.

Диагноз «вирусный гепатит С» подтвержден на основании данных иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест», а также определения HCV-РНК методом полимеразной цепной реакции (полуколичественный метод). У ряда больных диагноз подтвержден пункционной биопсией печени. Активность аланиновой аминотрансферазы (АЛТ) и аспарагиновой аминотрансферазы (АСТ) определяли с помощью наборов ЗАО «Вектор-Бест» колориметрическим динитрофенилгидразиновым методом по Райтману, Френкелю; общий билирубин — с использованием модифицированного метода Йендрашека-Грофа. Щелочная фосфатаза (ЩФ) и гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП) — с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) кинетическим методом (Спектрофотометр с проточной кюветой РМ-760, Германия). Активность β -галактозидазы сыворотки крови оценивали флуоресцентным методом с использованием субстрата 4-метилумбеллиферил- β -D-галактопиранозид (Melford Laboratories Ltd., England) по методу Barrett [2], активность

хитотриозидазы — 4-метилумбеллиферил- β -D-N,N',N''-триацетилхитотриозид ($C_{34}H_{47}N_3O_{18}$), как представлено ранее [9]. Активность матриксных металлопротеаз (ММП) в образцах сыворотки крови определяли с использованием флуоресцентного субстрата MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-DPA-Ala-Arg-NH₂ (ICN Biomedicals Inc, USA), представляемый производителем как специфический субстрат по отношению к ММП-2,7. Однако, по мнению Nagase и соавт. [13], чей метод был использован в данной работе, субстрат позволяет определять общую активность всех присутствующих матриксных металлопротеаз. Активность ММП выражали в мкмоль метилкумариламида (МСА)/л в час. Активность N-ацетилгексозаминидазы в сыворотке крови определяли флуоресцентным методом с использованием субстрата 4-метилумбеллиферил-2-ацетидамо-2-деокси-B-D-глюкопиранозид (Melford Laboratories Ltd., England).

Статистический анализ произведен при помощи пакета программ SPSS 9.0;10.0

Результаты

Среди обследованных групп у 32 (54,2%) человек уровень активности АЛТ составил $1,08 \pm 0,40$ мкмоль/л, у 27 пациентов (45,8%) — $0,45 \pm 0,15$ мкмоль/л. Нормальный уровень активности АСТ сыворотки крови был у 30 (50,8%) человек — $0,32 \pm 0,07$ мкмоль/л, повышен — у 29 (49,2%) больных ХВГС — $0,64 \pm 0,18$ мкмоль/л (Таблица 1).

Желтушное окрашивание кожных покровов и видимых слизистых определялось у 32 пациентов с ХВГС. Незначительное повышение уровня билирубина сыворотки крови наблюдалось у 9 (15,3%) больных ХВГС ($37,32 \pm 18,52$ мкмоль/л). Биохимические маркеры холестаза, ЩФ и ГГТП, были повышены соответственно у 9 (15,3%) и 8 (13,6%) пациентов (Таблица 2).

Все пациенты обратились за медицинской помощью в городской гастроэнтерологический центр по поводу болей билиарного характера и/или астенического синдрома. До обращения в клинику заболеваний печени у них диагностировано не было. У всех больных диагноз установлен после проведения исследования на маркеры вирусных гепатитов методом ИФА и ПЦР-диагностики.

Таблица 1

Активность АЛТ и АСТ в сыворотке крови у пациентов с ХВГС

Ферменты		Количество пациентов (n=59)		Mean*	SD**
		Абсолютное число	%		
АЛТ, мкмоль/л	>0,68	32	54,2	1,08	0,40
	≤0,68	27	45,8	0,45	0,15
АСТ, мкмоль/л	>0,45	29	49,2	0,64	0,18
	≤0,45	30	50,8	0,32	0,07

Примечание: * — среднее значение, ** — среднее квадратическое отклонение

Анамнестически предположить первоначальный источник инфицирования удалось у 38 (64,4%) человек. У 19 пациентов в анамнезе были оперативные вмешательства, у 3 из них были произведены гемотрансфузии; у 5 пациентов — эпизоды внутривенного употребления наркотиков, профессиональный контакт с кровью в анамнезе у 2 пациентов, 12 пациентов обращались за стоматологической помощью.

У пациентов с циррозом печени в исходе хронического гепатита С определен прогностический класс А по Чайльд-Пью. У 3 (33,3%) больных циррозом печени активность АЛТ сыворотки крови составляла $1,12 \pm 0,37$, что не превышает двух норм. Повышение АСТ сыворотки крови наблюдали у 6 (66,7%) пациентов. Биохимические маркеры холестаза — ЩФ, ГГТП и общий билирубин были повышены у 5 (55,6%) больных циррозом печени (Таблица 3).

У больных хроническим вирусным гепатитом С в сыворотке крови выявлены крайне низкие значения активности β -галактозидазы. Обнаружена достоверная обратная корреляционная зависимость активности фермента у пациентов и доноров ($r = -0,85$; $p = 0,00001$). Активность β -галактозидазы у пациентов составляла $0,12 \pm 0,11$ мкмоль МУФ/л в мин, что значительно ниже, чем у практически здоровых доноров — $0,72 \pm 0,13$ мкмоль МУФ/л в мин ($p = 0,0001$; 95% CI 0,66-0,52), однако ее уровень не зависел от биохимической активности процесса. У пациентов с активным ХВГ С уровень β -галактозидазы составил $0,14 \pm 0,02$, а у пациентов с нормальными значениями АЛТ — $0,11 \pm 0,11$ мкмоль МУФ/л в мин ($p = 0,34$). Данные представлены в таблице 4.

Можно полагать, что резкое снижение активности β -галактозидазы сыворотки крови являются следствием прямого действия вируса на клетки

Таблица 2

Биохимические маркеры холестаза у пациентов с ХВГ С

Маркеры холестаза		Количество пациентов (n)		Mean	SD
		Абсолютное число	%		
Билирубин, мкмоль/л	>20,5	9	15,3	37,32	18,52
	≤20,5	50	84,7	11,50	2,25
ЩФ, Е/л	>170	9	15,3	404,86	223,71
	≤170	50	84,7	167,10	43,61
ГГТП, ммоль/л	>4,0	8	13,6	8,10	4,42
	≤4,0	51	86,4	1,12	0,24

Таблица 3

Некоторые биохимические показатели сыворотки крови у пациентов с циррозом печени

Ферменты		Количество пациентов (n=59)		Mean	SD
		Абсолютное число	%		
АЛТ, мкмоль/л	>0,68	3	33,3	1,12	0,37
	≤0,68	6	66,7	0,47	0,15
АСТ, мкмоль/л	>0,45	6	66,7	0,69	0,13
	≤0,45	3	33,3	0,35	0,06
Билирубин, мкмоль/л	>20,5	5	55,6	42,14	18,20
	≤20,5	4	44,4	13,85	3,78
ЩФ, Е/л	>170	5	55,6	362,0	44,38
	≤170	4	44,4	215,0	45,09
ГГТП, ммоль/л	>4,0	5	55,6	7,3	3,39
	≤4,0	4	44,4	1,17	0,29

Таблица 4

Активность лизосомных ферментов и ММП-2,7 у больных ХВГ С, циррозом печени и доноров

Ферменты сыворотки крови	Доноры n=20		HCV n=59		Цирроз n=9	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Матриксные металлопротеазы, мкмоль МКА/л в час	258,1	38,95	236,3*	98,7	458,4*	21,7
β -галактозидаза, мкмоль МУФ/л в мин	0,72	0,13	0,12	0,11	0,13	0,11
N-ацетил-гексозаминидаза, мкмоль/л в мин	0,82	0,21	0,80	0,32	0,99	0,27
Хитотриозидаза, мкмоль МУФ/л в мин	4,25	1,25	5,7*	2,7	10,3*	7,8

Примечание: * — различия достоверны ($p < 0,05$)

печени. Нейраминидаза, входящая в состав вируса, после эндоцитоза вируса клетками печени может разрушить комплекс галактозидаза-нейраминидаза-катепсин А (так называемый стабилизирующий белок) [16].

Нами выявлена прямая достоверная корреляционная зависимость активности хитотриозидазы сыворотки крови у пациентов и доноров ($r=0,411$; $p=0,013$). Так, ее активность у больных вирусным гепатитом С составила $5,17 \pm 2,69$ мкмоль МУФ/л в мин, что достоверно выше, чем у доноров — $4,25 \pm 1,24$ ($p=0,033$; 95% CI 0,12-2,8), но достоверных различий активности хитотриозидазы сыворотки крови у больных с активным и неактивным гепатитом С отмечено не было. Активность данного фермента у больных с активной HCV-инфекцией составила $0,45 \pm 0,16$ мкмоль МУФ/л в мин, а неактивной — $0,5 \pm 0,15$ мкмоль МУФ/л в мин ($p=0,682$; таблица 4).

Отличия активности N-ацетилгексозаминадазы у больных хроническим вирусным гепатитом С и доноров нами не обнаружено ($p>0,05$). Также не выявлено достоверных отличий активности матриксных металлопротеиназ-2,7 у пациентов и доноров.

У больных циррозом печени в исходе вирусного гепатита С обнаружено достоверное повышение активности ММП-2,7 по сравнению с больными гепатитом С без признаков цирроза печени, соответственно $458,4 \pm 21,7$ и $236,3 \pm 98,7$ мкмоль МКА/л в час ($p=0,01$; 95% CI 381,6-62,4). Подобные закономерности выявлены в отношении хитотриозидазы, активность которой у больных циррозом печени составила $10,3 \pm 7,8$ мкмоль МУФ/л в мин, что достоверно выше, чем у больных гепатитом — $5,7 \pm 2,7$ ($p=0,032$; 95% CI 7,34-0,35). В то же время не найдено зависимости активности ММП-2,7 и хитотриозидазы от биохимической активности процесса (Таблица 4).

Выводы

Таким образом, нами обнаружено, что активность β -галактозидазы у больных хроническим вирусным гепатитом С достоверно снижена по сравнению с донорами и не зависит от биохимической активности процесса. Требуется дальнейшего исследования и анализа выявленное нами снижение активности β -галактозидазы сыворотки крови (ранее резкое достоверное снижение активности этого фермента в литературе не отмечено). Определена прямая достоверная корреляционная зависимость активности хитотриозидазы и ММП-2,7 сыворотки крови у пациентов и доноров, однако достоверных различий их активности у больных с активным и неактивным гепатитом не отмечено.

Обнаружено достоверное повышение актив-

ности хитотриозидазы и ММП у больных циррозом печени, не зависящее от биохимической активности процесса, что может рассматриваться в качестве одного из неинвазивных методов диагностики цирроза печени. Это, без сомнения, имеет не только теоретическое, но и практическое значение, так как в настоящее время верификация цирроза печени возможна только при использовании пункционной биопсии. Представляется важным дальнейшее исследование активности ММП, а так же их ингибиторов (TIMP-1,2), позволяющее на ранних сроках выявить развитие соединительной ткани в печени. Обнаруженное нами увеличение активности ММП и хитотриозидазы у больных циррозом печени требует дальнейшего изучения.

LYSOSOMAL ENZYMES OF BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS AND LIVER CIRRHOSIS

Yu.V. Yuzko, N.B. Voloshina, T.V. Alekseenko, N.G. Savchenko, T.A. Korolenko

The aim of study is to investigate dependence of serum ALT and lysosomal enzymes activity in patients with viral hepatitis C and liver cirrhosis, connection of changes with stage of the disease. We were trying to establish the cellular origin of secreted lysosomal enzymes (hepatocytes or macrophages). Patients with chronic viral hepatitis C revealed very low serum activity of β -galactosidase; there was no connection between this index and moderately elevated serum ALT activity. A direct correlational dependence of serum chitotriosidase with matrix metalloproteinase-2, 7 activity in serum in patients with chronic viral hepatitis C and blood-donors was discovered. The increase of serum chitotriosidase and matrix metalloproteinase activity was noted in the patients with liver cirrhosis. These indexes can be taken into account as uninvaseive method of liver cirrhosis diagnostics. The investigation of MMPs activity as well as MMPs inhibitors is perspective, giving an opportunity to determine the development of connective tissue in the liver at early stages of fibrosis formation. The increase of MMP and chitotriosidase activity in patients with liver cirrhosis demands further investigation.

Литература

1. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide / Jung K., Ha Y., Ha et al. // Journal of Veterinary Medicine, Series B. — 2004. — Vol. 51 (2). — P. 72-77.
2. Barrett A. Lysosomal enzymes / Barrett A. // Lysosomes: a laboratory handbook. — Amsterdam, London: North-Holland. — 1972. — P. 46-135.
3. Barrett A. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L

/ Barrett A., Kirschke H. // *Methods in Enzymology* / Lorand, L., ed.. — New York: Academic Press, 1981. — Vol. 80. — P. 535-561.

4. Chitotriosidase as a new marker of macrophage stimulation in a tumor model treated with cyclophosphamide and Ukrain / Korolenko T.A., Djanayeva S.J., Falameeva O.V. et al. // *Drugs Exptl. Clin. Res.* — 2000. — Vol. 27. — P. 279-283.

5. Circulating Matrix Metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid / Leroy V., Monier F., Bottari S. et al. // *The American Journal of Gastroenterology*. — 2004. — Vol. 99 (2). — P. 271-279.

6. Cotreatment with interferon-alpha and -gamma reduces liver fibrosis in a rat model / Takahara T., Sugiyama K., Zhang L.P. et al. // *Hepatology*. — 2004. — Vol. 39 (3). — P. 146-154.

7. Forns X. Can we identify liver fibrosis in HCV-infected patients without a liver biopsy? / Forns X., Bataller R. // *Current Hepatitis Reports*. — 2003. — Vol. 2. — P. 1-8.

8. Harvey S. Hepatitis / Harvey S. // *Hepatitis Annual Report*. — 2002. — Part 1. — P. 1-18.

9. Hyaluronic acid and endothelial damage due to paracetamol-induced hepatotoxicity / Williams A.M., Langley P.G., Osel-Hwediah J. et al. // *Liver International*. — 2003. — Vol. 23. — P. 110-115.

10. Kohler A. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.)) / Kohler A., Wahl E., Soffker K. // *Environ. Toxicol. Chem.* — 2002. — Vol. 21 (11). — P. 2434-2444.

11. Koj A. Complex analysis of genes involved in the

inflammatory response: interleukin-1-induced differential transcriptome of cultured human hepatoma HepG2 cells / Koj A. and Jura J. // *Acta Biochemica Polonica*. — 2003. — Vol. 50. — P. 573-582.

12. Mateescu R.B. The immunopathogenesis of viral hepatitis / Mateescu R.B., Rimbas M., Voiosu R. // *Rom. J. Intern. Med.* — 2004. — Vol. 42 (1). — P. 59-67.

13. Nagase H. Design and characterization of a fluorogenic substrate selectively hydrolyzed by stromelysin 1 (matrix metalloproteinase-3) / Nagase H., Fields C.G., Fields G.B. // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269. — P. 20952-20957.

14. Perspectives: towards a peptide-based vaccine against hepatitis C virus / Hunziker I.P., Zurbriggen R., Glueck R. et al. // *Mol. Immunol.* — 2001. — Vol. 38 (6). — P. 475-484.

15. Progression of fibrosis in untreated patients with hepatitis C virus infection / Lagging L.M., Westin J., Svensson E. et al. // *Liver*. — 2002. — Vol. 22. — P. 136-134.

16. Pshezhetsky A.V. Association of N-acetylgalactosamine-6-sulfatase with the multienzyme lysosomal complex of β -galactosidase, cathepsin A, and neuraminidase / Pshezhetsky A.V., Potier M. // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 28359-28365.

17. Reduced hepatic glycogen stores in patients with liver cirrhosis / Krähenbühl L., Lang C., Lüdes S. et al. // *Liver International*. — 2003. — Vol. 23. — P. 101-109.

18. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis / Johansen J.S., Christoffersen P., Moller S. et al. // *Hepatology*. — 2000. — Vol. 32. — P. 911-920.

19. Shimizu I. Impact of oestrogens on the progression of liver disease / Shimizu I. // *Liver International*. — 2003. — Vol. 23. — P. 63-69.