

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

© Багмут І.Ю., Граматюк С.М.

УДК 616.36-002.-022-008.9:(612.826.33.015.22 + 577.112.853 + 546.172.6)

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ БІОМАРКЕРІВ ДИСБАЛАНСУ МІЖ ЕНЕРГЕТИЧНИМ І ПЛАСТИЧНИМ ПОТЕНЦІАЛАМИ, ДЛЯ ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМУ РОЗВИТКУ ПЕЧІНКОВОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ВІРУСНОМУ ГЕПАТИТІ С*

Багмут І.Ю., Граматюк С.М.

Харківська медична академія післядипломної освіти, м. Харків

Обследовано 73 больных хроническим вирусным гепатитом С, которые проходили плановое обследование в Медико-Диагностическом центре АСК-Хелс г. Харьков. Всем больным проводили типирование вирусного гепатита генетически, установлено наличие 3 генотипов HCV-инфекции: За генотип был диагностирован у 13 больных, 2 генотип - 11, наибольшую группу составили пациенты с 1b генотипом вируса - 49. Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц, не имевших в анамнезе болезней печени. Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в лимфоцитах пациентов с ХВГС и явлениями печеночной энцефалопатии (n = 11) достоверно (p ≤ 0,01) выше - в 2,3 раза - по сравнению с группой контроля. Установленный метаболизм фосфотриоза в клетках крови, вероятно, позволяют предположить преимущественное использование фосфотриоза и нейрон-специфической енолазы для энергообмена и продукции АТФ, то есть можно считать возможным наличие дисбаланса между энергетическим и пластическим потенциалами в клетках крови больных хроническим вирусным гепатитом С, особенно в эритроцитах.

Ключевые слова: печеночная энцефалопатия, вирусный гепатит С, пластический потенциал.

Хронічні захворювання печінки та цироз печінки зареєстровано у 1,2 мільйона чоловік в Україні та сотні мільйонів людей у всьому світі. З значним збільшенням частоти метаболічного синдрому у всьому світі, вірусні гепатити супроводжуються поступовим наростанням печінкової енцефалопатії. Імовірність розвитку ускладнень при гепатиті С складає 20% випадків [1]. У більшості хворих на цироз печінки виникають ускладнення, пов'язані з портальною гіпертензією. Одним з таких рецидивуючих і важко виліковним ускладненням є печінкова енцефалопатія (ПЕ). Дослідження показали, що на печінкову енцефалопатію страждає від 30 до 45% пацієнтів з цирозом [2, 3].

Печінкова енцефалопатія або портосистемна енцефалопатія є синдромом значною мірою оборотного порушення функції головного мозку, що виникає у пацієнтів з гострою або хронічною печінковою недостатністю або коли печінка обминається портосистемними шунтами. Це призводить до спектру неврологічних порушень, починаючи від субклінічної дисфункції мозку до коми. Механізми, що викликають цю дисфункцію мозку, все ще залишаються в основному незрозумі-

лими [4, 5]. Класифікують печінкову енцефалопатію за даними робочої групи 11-го Всесвітнього конгресу гастроентерології, (Відень), на три типи. На підставі захворювання печінки, однією з груп є вірусний гепатит.

Одним з перспективних напрямків, що дозволяють охарактеризувати патофізіологічні механізми розвитку енцефалопатії при вірусних гепатитах в організмі, є дослідження особливості метаболічних процесів клітин. Пов'язано це з тим, що всі зміни клітинної генетичної програми реалізуються, в тому числі і через метаболічні процеси. При цьому великий інтерес представляє вивчення метаболізму не тільки гепатоцитів, але і клітин периферійної крові. Це обумовлено тим, що дисметаболічні процеси в клітинах крові викликають розвиток їх дисфункції [3 - 5].

Відомо, що одним з потужних ланок розвитку печінкової енцефалопатії з подальшим розвитком печінкової коми є цироз. Таким чином, можемо припустити, що дисметаболічні процеси в еритроцитах і їх дисфункція можуть опосередковувати порушення мікроциркуляції, тим самим сприяти прогресії цирозу та, як наслідок, розвитку печінкової енцефалопатії [6 - 8].

* Цитування при атестації кадрів: Багмут І.Ю., Граматюк С.М. Прогностичне значення біомаркерів дисбалансу між енергетичним і пластичним потенціалами, для вивчення механізму розвитку печінкової енцефалопатії при хронічному вірусному гепатиті С // Проблеми екології і медицини. – 2017. – Т. 21, № 5-6. – С. 15–18.

У роботах деяких авторів було встановлено, що дисметаболичні процеси в лімфоцитах прямо корелюють з розвитком їх дисфункції, зокрема зі зниженням індексу бласттрансформації, реакцій розеткоутворення [9-11].

Ферменти, відібрані для цього дослідження каталізують різні шляхи використання гліколізу - як енергоутворюючих, так і пластичних (споживання гліцерин-3-фосфату для синтезу фосфоліпідів, що будують клітинні мембрани). Для енергообміну еритроцита гліколіз має центральне значення. Відомо, що дисбаланс пулу аденілат, дефіцит АТФ, ведуть до збільшення агрегаційної здатності еритроцитів, порушення пластичних процесів, зниження їх деформування, підвищенню жорсткості мембран. У лімфоцитах порушуються функції Т-лімфоцитів, такі як проліферація, цитотоксичність [13-15].

Одним із суперечливих з діагностичної точки зору є фермент нейронспецифічна енолаза (НСЕ). З літературних даних [16] відомо, що НСЕ - один з ферментів гліколізу (2-фосфо-D-гліцерато-гідроліаза), існуючий у вигляді декількох димеризованих ізоферментів (aa, ab, ay, bb і уу), утворених з трьох субодиниць - a, b і y. Накопичено великий експериментальний і клінічний матеріал, що стосується аналізу НСЕ в біологічних рідинах при різних патологічних станах. Нейронспецифічна енолаза є єдиним відомим в даний час загальним маркером всіх диференційованих нейронів і відноситься до внутрішньоклітинних ензимів центральної нервової системи [13 - 16]. Однак на сьогодні не існує комплексного вивчення даного ферменту у хворих на хронічний вірусний гепатит С, як маркера печінкової енцефалопатії.

Таким чином, аналіз сучасного стану проблеми діагностики розвитку печінкової енцефалопатії у хворих на хронічний вірусний гепатит С, показав значну варіабельність підходів за даним питанням, що при достатньо помірних успіхах свідчить про актуальність наукового пошуку за цим напрямом. Зокрема визначається гострий дефіцит надійних способів вибору індивідуалізованої програми комплексного лікування, діагностики та прогнозу печінкової енцефалопатії у хворих на хронічний вірусний гепатит С. Розв'язання цієї проблеми потребує екстенсивного підходу, що включав би тестування і валідацію біомаркерів, придатних для прогнозування ризику розвитку печінкової енцефалопатії при вірусному гепатиті С.

Мета дослідження – визначення предиктивно-прогностичних біомаркерів дисбалансу між енергетичним і пластичним потенціалами в клітинах крові хворих на хронічний вірусний гепатит С.

Матеріали та методи дослідження

Як об'єкт дослідження було обрано три групи хворих з хронічним вірусним гепатитом С, в залежності від генотипу вірусу та наявності печінкової енцефалопатії. Обстежено 73 хворих на хронічний вірусний гепатит С, 20 осіб контрольної групи були здорові. Пацієнтів відбирали на підставі їх стабільного клінічного стану протягом останніх 3 місяців. HCV-інфекція була діагностована позитивністю тестів - анти-HCV і HCV-RНК протягом щонайменш 6 місяців.

Протокол дослідження було проведено у відповідності до Гельсінської декларації, переглянутої у 1989 році. Всі обстежені пацієнти були поінформовані про дослідження та дали письмову згоду.

Нами була досліджена активність ферментів що утилізують фосфотріози (гліцерин-3-фосфатдегідрогенази (ГЗД) і глицеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (ГАФД)). Активність ГАФД і ГЗД визначалася швидкістю відновлення NAD⁺, який бере участь у відповідних реакціях як акцептор атомів водню. Дія цих ферментів була виражена в нмоль / хв. • л. Концентрація білка була визначена методом Лоурі.

Визначення вмісту нейрон-специфічної енолази в сироватці крові проводили за допомогою Human Neuron Specific Enolase ELISA Kit (Alpha diagnostic, USA) відповідно до інструкції виробника.

Концентрація АТФ в суспензії еритроцитів була визначена методом ПН. Yaverbaum et al., Концентрації ADP і AMF by H.U. Бергмейер [7-10].

Незалежний (непарний) t-тест Student (двотавровий) був обраний для перевірки значущості відмінностей серед засобів малих "n" вибірок множин.

Результати та їх обговорення

В еритроцитах пацієнтів хворих на хронічний вірусний гепатит С, було встановлено достовірне зниження активності гліцерин-3-фосфатдегідрогенази ($p \leq 0,005$) ферменту, що каталізує утворення гліцерин-3-фосфату, який виступає в ролі проміжного з'єднання в біосинтезі тригліцеридів. Як ми бачимо з таблиці 1, вона знижена в середньому в 1,5 рази у хворих усіх груп, в порівнянні з контролем.

Активність глицеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, що характеризує інтенсивність гліколітичного розщеплення глюкози, навпаки, була достовірно підвищена ($p \leq 0,01$) (таблиця 1). Це пов'язано з переважним споживанням гліколітичних фосфометаболітів в процесах енерго-продукції, тобто гліколітичному синтезі АТФ. До того ж, це може свідчити про підвищення потреби клітини в 2,3-бісфосфогліцерате, який забезпечує процес передачі кисню в тканини.

Таблиця 1
Активність гліцерин-3-фосфатдегідрогенази і глицеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в еритроцитах крові у пацієнтів хворих на хронічний вірусний гепатит С.

Показник	ХВГС генотип 1b (n=49)	ХВГС генотип 2 (n=11)	ХВГС генотип 3a (n=13)	Контрольна група (n=20)
Активність ГЗД в еритроцитах нмоль/мин·л	6,83±0,05*	5,32±0,45*	5,7±0,15*	12,25±1,13
Активність ГАФД в еритроцитах нмоль/мин·л	5,75±0,08*	8,95±0,6*	7,29±0,26*	5,16±0,27

Примітка: * $p < 0,001$ в порівнянні з групою контролю

Встановлено, що в еритроцитах пацієнтів хворих на хронічний вірусний гепатит С достовірно ($p \leq 0,01$) підвищена активність ГАФД в 2,3 рази, в порівнянні з нормою. При порівнянні пацієнтів з різними генотипами не встановлено різниці між групами, однак нами

встановлено достовірні відмінності між хворими з явищами печінкової енцефалопатії та без неї. Таким чином, в ході дослідження було виявлено, що у хворих на хронічний вірусний гепатит С, посилюється використання фосфотріоз в гліколізі.

Нами були проведені дослідження активності да-них ферментів у лімфоцитах крові. У таблиці 2 наведе-ні результати активності ГЗФД і гліцерин-3-фосфат-дегідрогенази в лімфоцитах. Таким чином, в еритро-цитах і лімфоцитах крові встановлена загальна тен-денція до зниження активності гліцерин-3-фосфат-дегідрогенази, проте найбільш виражені зміни спо-

стерігаються в еритроцитах крові. Активність глице-ральдегід-3-фосфатдегідрогенази в лімфоцитах ви-ще в порівнянні з групою контролю (в нормі активність глицеральдегід-3-фосфатдегідрогенази склала $0,69 \pm 0,02$ нмоль / хв • л), проте, ці зміни не настільки знач-но виражені, як в еритроцитах.

Таблиця 2.

Активність гліцерин-3-фосфатдегідрогенази і глицеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в лімфоцитах крові у хворих на хронічний вірусний гепатит С.

Показник	ХВГС з явищами печінкової енцефалопатії (n=11)	ХВГС при відсутності печінкової енцефалопатії (n=21)	Норма (n=20)
Активність ГЗД в лімфоцитах нмоль/мин·л	1,10±0,03*	1,16±0,05*	1,55±0,15
Активність ГАФД в лімфоцитах нмоль/мин·л	2,95±0,03*	3,29±0,02*	0,69±0,02

Примітка: * $p < 0,001$ в порівнянні з групою контролю

Причому наростання активності ГАФДГ можна пов'язувати не тільки з підвищенням потреби еритроцита в АТФ, а й зі збільшенням продукції 2,3 діфосфогліцерата, необхідного для вступу кисню до тканин у пацієнтів з явищами печінкової енцефалопатії. Паралельне зниження активності ГЗФДГ підтверджує припущення про наростання енергетичних потреб клітини.

Підтвердженням наших висновків є результати до-слідження аденілових нуклеотидів. У зв'язку з вище-викладеним, представляло інтерес, вивчення рівню аденілових нуклеотидів (аденозінтрифосфат (АТФ), аденозіндіфосфат (АДФ), аденозінмонофосфат (АМФ) - як маркерів енергетичного дефіциту у хворих на хронічний вірусний гепатит С в залежності від наявно-сті печінкової енцефалопатії. При аналізі виявлено, що у хворих з проявами печінкової енцефалопатії від-бувається статистично значуще зниження ($p < 0,001$) в еритроцитах вмісту АТФ в середньому на 53,5% в по-рівнянні з контролем. Приблизно така ж динаміка спо-

стерігалася у пацієнтів з генотипом вірусу 1b, а саме зниження відмічалось на 39% при порівнянні з кон-трольними значеннями. Групи пацієнтів з генотипами 2 та 3а при відсутності проявів печінкової енцефалопатії не мали між собою достовірної різниці.

За вмістом АТФ групи хворих при наявності печін-кової енцефалопатії та без неї, також достовірно від-різнялися. Слід зазначити, що на цьому тлі зміст АДФ у хворих з явищами печінкової недостатності мав те-нденцію до зниження, а у хворих на хронічний вірус-ний гепатит С при її відсутності, навпаки, визначалося статистично значуще ($p < 0,001$) підвищення на 22% в порівнянні з контролем. Рівень АМФ в разі наявності печінкової енцефалопатії в порівнянні з контрольною групою, достовірно зменшувався на 90%. При відсут-ності печінкової недостатності спостерігалось досто-вірне ($p \leq 0,05$) зниження АМФ - майже в 2,5 рази в по-рівнянні з контролем.

Таблиця 3

Вміст аденілових нуклеотидів у обстежуваних хворих в залежності від наявності печінкової енцефалопатії (Ме [25%; 75%])

Група хворих	Показник	АТФ, ммоль/л	АДФ, ммоль/л	АМФ, ммоль/л
ХВГС з явищами печінкової енцефалопатії		1,38 * [1,27; 1,50]	1,36*^ [1,24; 1,51]	1,64*^ [1,53; 1,70]
ХВГС при відсутності печінкової енцефалопатії		1,42±0,13*	0,81 * [0,70;08]	1,10 * [1,03; 1,14]
Контроль		2,25 [2,10; 2,2]	1,01 [0,93; 1,08]	0,58 [0,52; 0,69]

Примітка: * $p < 0,001$ в порівнянні з групою контролю, ^ $p < 0,001$

Передбачається, що порушення біоенергетичних процесів є одним з пускових механізмів розвитку печін-кової енцефалопатії вірусної етіології [13-17]. В ре-зультаті мітохондріальної дисфункції, виникає дефі-цит макроергів викликає погіршення роботи енергоза-лежних мембранних каналів, зокрема $Na^+ - ^+$ -АТФ обмінників, $Ca^{2+} - ^+$ -АТФ обмінників, що призводить до депонування іонів Ca^{2+} в цитозолі, з наступною акти-вацією Ca^{2+} залежної ферментної ефекторної стадії апоптозу. Прогресуючий енергодефіцит перемикає енергетичний метаболізм на гліколіз, внаслідок чого відбувається накопичення недоокислених продуктів жирних кислот - ацил-КоА, ацетил-КоА, НАДН • Н з пригніченням піруватдегідрогенази, зниженням утилі-зації пірувату і перетворенням його в лактат.

У контрольній групі показники НСЕ становили $7,89 \pm 0,81$ нг/мл тоді як, рівні у хворих на хронічний ві-русний гепатит С дорівнювали $12,97 \pm 0,85$ нг/мл, що становить майже 65,3%. Достовірно ($p \leq 0,05$) збільше-ний вміст НСЕ частіше 83% хворих, реєстрували у пацієнтів з явищами печінкової енцефалопатії, що можливо свідчить про пошкодженням нейронів мозку у пацієнтів з енцефалопатією вірусного генезу. Однак причина цього в даний момент повністю не ясна і ви-магає нашого подальшого вивчення. Імовірною при-чиною цієї тенденції можуть бути також, кількісні або певні функціональні відмінності в гальмівних синап-сах, основною роллю яких є захист нейронів від гіпер-збудливості.

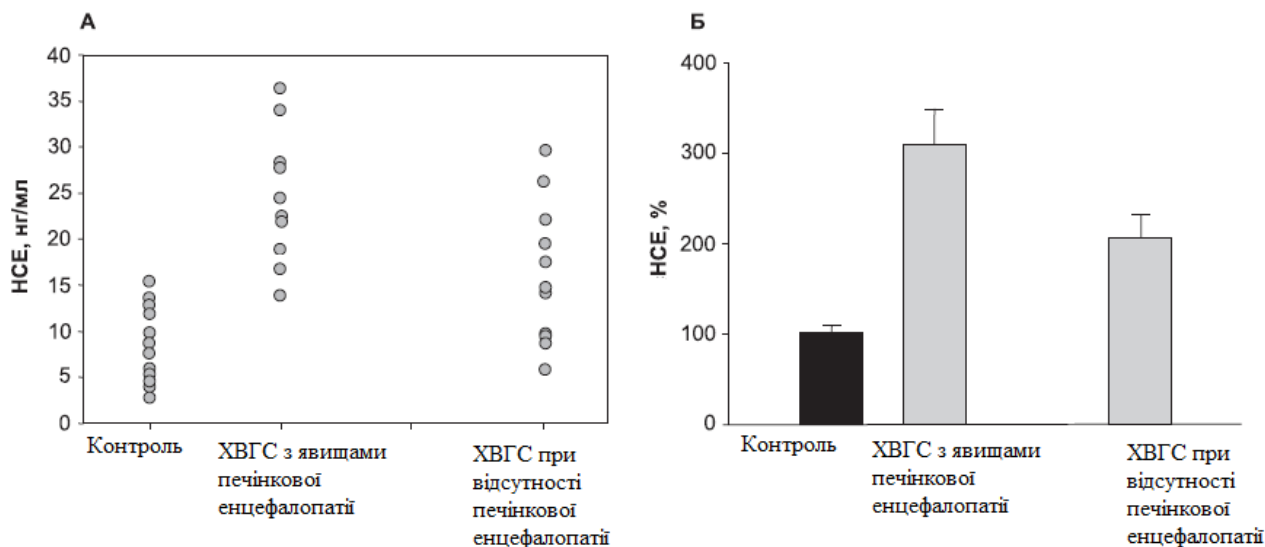


Рисунок 1. Рівні нейронспецифічної енолази у хворих на хронічний вірусний гепатит С в залежності від наявності печінкової енцефалопатії.

В умовах неповної ішемії або при спробі неадекватної реперфузії відбувається подальше постачання до мозку енергетичного субстрату (глюкози) для анаеробного гліколізу, а це веде до посилення лактоацидоза і поглиблення ураження нейронів. Дослідження даного питання потребує подальшого детального підходу в вивченні, що є перспективою нашого подальшого дослідження.

Висновки. Встановлення зміни метаболізму фосфотріоз в клітинах крові, ймовірно, дозволяють припустити переважне використання фосфотріоз та нейрон-специфічної енолази для енергообміну і продукції АТФ, тобто можна вважати можливим наявність дисбалансу між енергетичним і пластичним потенціалами в клітинах крові хворих на хронічний вірусний гепатит С, особливо в еритроцитах.

Література

1. Sanyal A.J., Mullen K.D., Bass N.M. The treatment of hepatic encephalopathy in the cirrhotic patient. // *Gastroenterol Hepatol.* - 2010. - Т. - 6. - P. (4 Suppl 8):1-12.
2. Bismuth M., Funakoshi N., Cadranet J.F. Hepatic encephalopathy: From pathophysiology to therapeutic management. // *Eur J Gastroenterol Hepatol.* - 2011. - Т.23. - P. 8-22.
3. Butterworth R.F. Editorial: Rifaximin and minimal hepatic encephalopathy. // *Am J Gastroenterol.* - 2011. - Т.106. - P: 317-328.
4. Seyan A.S., Hughes R.D., Shawcross D.L. Changing face of hepatic encephalopathy: Role of inflammation and oxidative stress. // *World J Gastroenterol.* - 2016. - Т.16. - P.3347-3357.
5. McPhail M.J. Pathogenesis and diagnosis of hepatic encephalopathy. / McPhail M.J., Bajaj J.S., Thomas H.C., Taylor-Robinson S.D. // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* - 2017. - Т.4. - P. 365-378.
6. Бакурова О. М., Борзенко Б. Г., Миронова К. О. Порухення обміну клітин крові при раці шлунка // *Перспективи медицини та біології.* - 2011. - Т. 3, № 1. - С.45-46.
7. Бакурова О. М., Попович О. Ю., Миронова К. О. и др. Зміни активності аденозіндезамінази при підвищеному

онкоризику та карциномах різної локалізації // *Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина».* - Выпуск 3 (42). - 2011. - С. 19- 23.

8. Борзенко Б.Г., Жебеленко Я.Г., Зуйков С.О. и др. Особенности системы антирадикальной защиты и углеводный обмен эритроцитов у больных язвенной болезнью // *Загальна патологія та патологічна фізіологія.* - 2010. - Т.5, № 3. -С.186 - 189.
9. Коржов В.И., Жадан В.Н., Коржов М.В. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты // *Журн. АМНУ.* - 2007. - Т.13, № 1. - С. 3-19.
10. Лишневская В.Ю., Дужак Г.В. Эритроциты при старении // *Материали IV національного конгресу геронтологів і гериатрів України, 11-13 жовтня 2005 р., м. Київ. - Проблеми старения и долголетия.* - 2005. - Т.14 (приложение). - С. 157 - 158.
11. Страшок Л.А. Оксидативный стресс и гормональный статус у подростков с дуоденальной язвой // *Международный медицинский журн.* - 2008. - №1. - С. 88-91.
12. Nilsson E. Incidence, clinical presentation and mortality of liver cirrhosis in Southern Sweden: a 10-year population-based study. / Nilsson E., Anderson H., Sargenti K., Lindgren S., Prytz H. // *Alimentary pharmacology & therapeutics.* - 2016. - Т. 43(12). - P. 1330-1339.
13. Vandenbulcke H. Alcohol intake increases the risk of HCC in hepatitis C virus-related compensated cirrhosis: A prospective study. / Vandenbulcke H., Moreno C., Colle I., Knebel J.F., Francque S., Serste T., et al. // *Journal of hepatology.* - 2016. - Т. 51(6). - P.1972-1978.
14. Jepsen P., Vilstrup H., Andersen P.K. The clinical course of cirrhosis: The importance of multistate models and competing risks analysis. // *Hepatology.* - 2015. - Т. 62(1). - P. 292-302. doi: 10.1002/hep.27598.
1. 15 Kuk D., Varadhan R. Model selection in competing risks regression. // *Statistics in medicine.* - 2013. - Т. 32(18). - P. 3077-3088. doi: 10.1002/sim.5762.
15. Féray C. Is HCV infection a neurologic disorder? // *Gastroenterology.* - 2012. - Т.142. - P. 428-431.
16. Monaco S. HCV-related nervous system disorders. / Monaco S., Ferrari S., Gajofatto A., Zanusso G., Mariotto S. // *Clin Dev Immunol.* - 2012. - Т. 2012:23. - P. 6148 - 6153.