

Зв'язок активності протеолітичних ферментів ММП-2 та ММП-9 з рівнем фібронектину та його фрагментованістю у хворих на цироз печінки

**О.П. ШЕВЧЕНКО, М.С. СУРЕМЕНКО,
А.О. КУЛІНІЧ, А.І. ШЕВЦОВА**

м. Дніпропетровськ

*З'ясовано, що при цирозі печінки відмічається підвищення концентрації фібронектину та активності ММП-2, та значні зміни ступеню його фрагментованості. Зниження фібронектину корелює з рівнем летальності ($r = -0,47$; $p < 0,05$). Порівняльний аналіз спектрів фФН, що утворюються під дією ММП-2 та ММП-9 у модельній системі з тими, що знайдені у плазмі крові хворих на ЦП, дозволив визначити, що фрагменти *in vitro* та *in vivo* відрізняються, що можливо пов'язане з дією інших протеїназ.*

Ключові слова: *фібронектин, фрагменти, ММП, ММП-2, ММП-9*

Фібронектин (ФН) – поліфункціональний глікопротеїн, який виконує важливу роль в запальних і регенеративних процесах, організації міжклітинного матриксу, процесах підтримання гемостазу, а також приймає участь в патогенезі різних захворювань [1]. Вивчається його клінічне значення при шоку, сепсисі, гострій хірургічній патології, ДВЗ – синдромі, онкопатології, захворювань системи крові, патології печінки, тощо. Він синтезується різними клітинами, у тому числі гепатоцитами. У крові переважає плазмова форма ФН, яка існує переважно у формі димера, зв'язаного двома дисульфідними зв'язками на С-термінальному кінці. Кожен мономер ФН складається з гомологічних послідовностей типу I, II та III; ділянки між ними чутливі до дії протеолітичних ферментів, під дією яких утворюються фрагменти фібронектину (фФН) [2, 3]. На сьогоднішній день визначені фФН, що утворюються під дією окремих протеїназ. Відомо, що при патологічних станах змінюється концентрація ФН в крові, а також ступінь його деградації [4, 5]. При ураженні печінки активуються зірчаті клітини, активується і збільшується позаклітинний матрикс, який містить колаген I, III типів, протеоглікани, фібронектин, гіалуронову кислоту та інші глікокон'югати матриксу та утворюється фіброзна тканина [4]. Другим провідним фактором утворення фіброзної тканини є руйнування протеїнів матриксу, який забезпечується рядом ферментів, а саме, металопротеїназами (ММП) [4, 5, 6]. В той же час, інформація щодо стану даного глікопротеїну та активності ММП при хронічних дифузних захворюваннях печінки та цирозі печінки в літературі поодинокі [2, 3, 7]. Наявні одиничні дослідження носять у край суперечливий, іноді взаємовиключний характер.

Мета. Дослідити рівень та ступінь деградації ФН плазми крові хворих на цироз печінки. Визначити спектр фрагментів ФН, що утворюються під дією матриксних металопротеїназ-2 та -9 (ММП-2 та ММП-9) в умовах *in vitro* та у хворих на цироз печінки.

Матеріали і методи

Нами було обстежено 23 хворих на цироз печінки вірусного генезу (ЦП), діагноз було встановлено на підставі клініко-анамнестичних даних, рутинних біохімічних методів дослідження печінкового комплексу, білкових фракцій сироватки крові, УЗД черевної порожнини, підтверджено серологічно методом ІФА. За функціональним станом по Чайлд-Пью хворі розподілились наступним чином: класу В – 11 та С – 12 хворих. До контрольної групи увійшли 12 здорових осіб.

У хворих на висоті клінічних проявів у сироватці крові визначали концентрацію ФН методом імунодоту з подальшою обробкою в програмі GelProAnalyser 32. Розщеплення ФН *in vitro* проводили шляхом інкубації комерційного препарату ФН (Sigma, США) з протеїназами ММП-2 (3.4.24.24) (Sigma США) та ММП-9 (3.4.24.35) (Sigma США). Для дослідження були обрані часові інтервали 6, 12, 24 год. Визначення молекулярної маси отриманих фрагментів здійснювали за допомогою маркерів фірми Bio-Rad Lab (Німеччина). Дослідження спектра фФН, що утворюються *in vivo* та *in vitro* проводили шляхом SDS-електрофорезу у градієнті щільності ПААГ 5-17,5% та вестерн-блот аналізу з використанням кролячих антитіл до ФН. В якості позитивного контролю використовували комерційний препарат ФН плазми (Sigma, США).

Рівень активності цинкових протеїназ – желатиназ (ММП-2 та ММП-9) визначали методом прямої желатин-зимографії з попереднім вертикальним електрофорезом (Gelatin-SDS-zymography technique). Протеолітична активність желатиназ оцінювалась як безфарбні смуги на синьо-блакитному фоні, локалізація яких відповідала молекулярній масі кожного з ферментів згідно стандартів молекулярної маси (ICN). Кількісну оцінку ММП-2 та ММП-9 проводили за допомогою денситометрії гелю оптичним сканером. Статистичну обробку проводили з допомогою програми Статистика 6.0.

Результати

Виявлено, що в період розпаду хвороби при ЦП вміст ФН достовірно знижувався і становив $213,4 \pm 17,65$ мкг/мл у порівнянні зі здоровими донорами – $328,21 \pm 16,97$ мкг/мл ($p < 0,001$). Концентрація ФН відрізнялась у групах хворих в залежності від класу ЦП і найбільше зниження даного показника спостерігалось при тяжкому перебігу. При 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 ($r = -0,47$; $p < 0,05$). Це може бути обумовлене його надмірним споживанням в якості опсоніну для виведення з крові різних мікрочастинок, в тому числі мікробних ліпополісахаридів та імунних комплексів [1, 2]. Ще однією причиною зниження концентрації ФН може бути недостатня синтетична функція гепатоцитів, що являються основним джерелом ФН плазми [3].

При дослідженні фрагментованості ФН плазми виявлено, що хворих на ЦП ступінь деградації ФН підвищується у порівнянні зі здоровими донорами (рис.1). В даній групі хворих містяться високомолекулярні (220 кДа та більше) та низькомолекулярні фрагменти ФН (72–60 кДа, 49–15 кДа) Підвищення фрагментованості ФН може свідчити про активізацію протеолітичних процесів та посилення деградації екстрацелюлярного матриксу, одним зі складових якого є ФН.

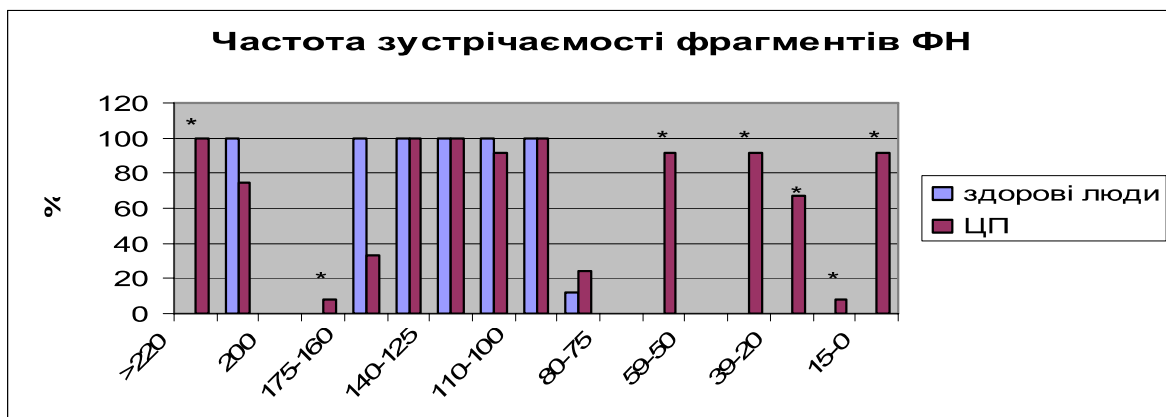
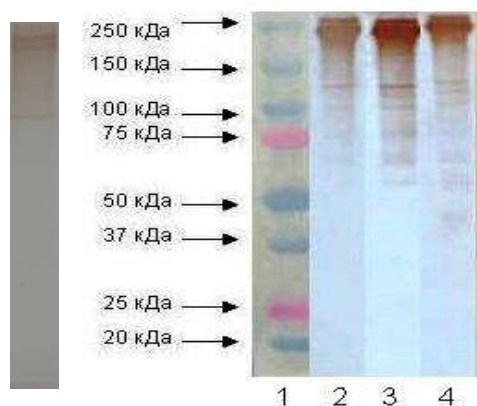


Рис. 1. Частота виявлення фрагментів фібронектину (%) у досліджуваних групах (* $p < 0,001$ у порівнянні із здоровими людьми).

Як приклад, наводимо блотограму дії ММП-2 на ФН (рис. 2.)



контроль

Рис. 2. Блотограма фрагментів фібронектину, що утворюються під дією цинкових протеаз *in vitro*: 1 – маркер; 2, 3, 4 – через 6, 12 та 24 год інкубації з ММП-2 (6 год).

Інкубація ФН з ММП-2 та ММП-9 показала, що обидва ферменти досить повільно розщеплюють цей глікопротеїн. Після шестигодинної обробки ФН ММП-2 спектр фФН містив 6 поліпептидних зон, при збільшенні часу дії ферменту до 12 год з'явився фрагмент 94 кДа, а після інкубації впродовж доби додатково визначались фФН з молекулярною масою (М.м.) 90, 70, 64, 42 кДа. Як вказано у наших попередніх роботах, у літературі згадуються лише фФН 120 та 70 кДа [4], що утворюються під дією цього ферменту. За отриманими нами даними спектр фФН, що продукувались ММП-2, був ширшим і містив поліпептиди з М.м. від 94 до 42 кДа. Що стосується фФН 120 кДа, то в наших попередніх роботах було показано, що він визначається лише впродовж першої години дії ММП-2 і зникає при збільшенні тривалості дії ферменту [5]. Серед фФН, що продукувались ММП-9, слід відзначити поліпептиди 90 та 74 кДа, які утворювались після 6 год інкубації з ферментом. Збільшення часу інкубації до 12 год не призводило до появи нових фрагментів, і лише при тривалості дії ферменту впродовж доби виявлявся фФН 42кДа. При порівнянні спектру фФН, що визначались в плазмі крові хворих на ЦП та фрагментів, що утворювались під дією ММП виявлено деякі фФН, що є характерними для дії желатиназ. Однак, більша частина спектру фФН не підпадає під дію цих ферментів. Вочевидь, поява інших фФН обумовлена дією інших протеїназ, що можуть активуватись при патологічних станах.

При всіх нозологічних формах визначались ММП-2 та ММП-9, при чому ММП-9 визначались як в активній формі (83 кД), так і у більшості хворих у не активній, латентній формі у вигляді зимогенів (про ММП-9) – 99 кД. ММП-2 визначались в активній формі (62 кД), а зимогенів про ММП-2 (74 кД) не було виявлено у жодному випадку.

Активність желатиназ змінювалась у значних межах, але у всіх групах хворих спостерігалось достовірне підвищення активності ММП-2 до 1,4 рази. Рівень активності про-ММП-9 і активній форми ММП-9 в групах дослідження був значно меншим у зрівнянні з контролем до 0,7 рази. Нами не було виявлено кореляційних зв'язків між рівнем активності ММП та концентрацією ФН.

Висновки

1. Наведені данні свідчать про зниження концентрації ФН та значні зміни ступеню його фрагментованості при різних функційних класах ЦП, що, в свою чергу, може свідчити про підвищення процесів деградації компонентів сполучної тканини. Значне зниження концентрації ФН може бути корисним прогностичним фактором несприятливого перебігу ЦП (корелює з рівнем летальності ($r = -0,47$; $p < 0,05$)).

2. У всіх групах хворих достовірне підвищення активності ММП-2 до 1,4 рази. Рівень активності про-ММП-9 і активної форми ММП-9 в групах дослідження був значно меншим у зрівнянні з контролем до 0,7 рази.

3. Порівняльний аналіз спектрів фФН, що утворюються під дією ММП у модельній системі з тими, що знайдені у плазмі крові хворих на ЦП, дозволив визначити, що фрагменти *in vitro* та *in vivo* відрізняються, що можливо пов'язане з дією інших протеїназ – трипсину, хімотрипсину, тромбіну, еластази, колагенази, тощо.

Література

1. Circulating fibronectin to C-reactive protein ratio and mortality: a biomarker in COPD? / S. F. P. Man, L. Xing, J.E. Connett [et al.] // Eur. Respir. J. – 2008. – Vol. 32. – P. 1451–1457.

2. Clemmensen I. Fibronectin and its role in connective tissue diseases / I. Clemmensen // Eur. J. Clin. Invest. – 2008. – Vol. 11, N 3. – P. 145–146.

3. Левитан Б.Н. Плазменный фибронектин как маркер синдрома. Эндогенной интоксикации при хронических гепатитах и циррозах печени / Б.Н. Левитан, А.Р. Умерова, А.В. Астахин // Кубанский национальный медицинский вестник. – 2009. – Т. 109, № 4. – С. 116–120.

4. Гордієнко Ю.А. Активність желатиназ і деградація фібронектину при метаболічних порушеннях та проліферативних захворюваннях крові / Ю.А. Гордієнко, А.О. Кулініч, Т.П. Ніколаєнко-Камишова, А.І. Шевцова // Мед. хімія. – 2009. – Т. 11, № 3. – С. 74–76.

5. Кулініч А.О. Утворення фрагментів фібронектину під дією різних протеолітичних ферментів / А.О. Кулініч, Г.С. Маслак // Матеріали V Міжнар. наук. конф. «Молодь та поступ в біології» (Львів, 12–15 травня 2009 р.). – Львів, 2009. – С. 48–49.

6. Кулініч А.О. Деградація плазмового фібронектину під дією серинових та цинкових протеаз / А.О. Кулініч, А.І. Шевцова, А.С. Маслак, А.С. Скромная, О.Е. Грунговська // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2009. – № 4. – С. 59–65.

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

Взаимосвязь активности протеолитических ферментов ММП-2 и ММП-9 с уровнем фибронектина и его фрагментированностью у больных циррозом печени

**О.П. ШЕВЧЕНКО, Н.С. СУРЕМЕНКО,
А.А. КУЛИНИЧ, А.И. ШЕВЦОВА**

*Исследовано, что при циррозе печени отмечается повышение концентрации фибронектина (ФН) и активности ММП-2, и значительные изменения степени его фрагментированности. Снижение ФН коррелирует с уровнем летальности ($r = -0,47$; $p < 0,05$). Сравнительный анализ спектров фрагментов ФН, что образуются под действием ММП-2 и ММП-9 в модельной системе с теми, которые найдены в плазме крови больных на ЦП, позволил определить, что фрагменты *in vitro* и *in vivo* отличаются, что возможно связано с действием других протеиназ.*

Ключевые слова: фибронектин, фрагменты, ММП, ММП-2, ММП-9

Intercommunication of activity of photolytic enzymes of MMP-2 and MMP-9 with the level of fibronectin and him fragmentation for patients by cirrhosis

**O. SHEVCHENKO, N. SUREMENKO,
A. KULINICH, A. SHEVTSOVA**

It is investigational, that at cirrhosis the increase of concentration of fibronectin (FN) and activity of MMP- 2, and considerable changes of degree of him, is marked fragmentation. The decline of FN correlates with the level of lethality ($r = - 0,47$; $p < 0,05$). The comparative analysis of spectrums of fragments of FN, that appear under the action of MMP-2 and MMP-9 in the model system with those which are found in plasma of blood of patients on CPU, allowed to define that the fragments of in vitro and in vivo differ, that is possibly related to the action of other proteases.

Keywords: *fibronectin, fragments, MMP, MMP-2, MMP-9*

УДК 616.98:578.828ВІЛ:616-002.5.]-036.8.(477.63)

Значення туберкульозної ко-інфекції у структурі ВІЛ-асоційованих хвороб та смертності ВІЛ-інфікованих хворих

**Л.Р. ШОСТАКОВИЧ-КОРЕЦЬКА, О.П. ШЕВЧЕНКО,
О.В. МУЛЬЧЕНКО, О.В. ВОРОНЦОВА, О.О. ЛІСНИЧА,
Н.В. ОКУНЕВИЧ**

м. Дніпропетровськ

З'ясовано, що основну питому вагу серед опортуністичних інфекцій складає туберкульоз – понад 70%. Значну питому вагу у структурі летальності ВІЛ-інфікованих хворих становить туберкульозна інфекція. Зростання показника смертності від СНІДу пов'язано з виявленням туберкульозу на пізній стадії та на 3 та 4 стадії ВІЛ-інфекції, що сприяє прогресуванню інфекції та неможливості призначення ВААРТ при наявності активного туберкульозу на фоні тяжкого імунodefіциту, а відсутність діагнозу туберкульозу – до відсутності лікування туберкульозу.

Ключові слова: *ВІЛ-асоційований туберкульоз, прогресування ВІЛ/СНІД, смертність*

Проблема туберкульозу та ВІЛ/СНІДу гостро стоїть перед усією світовою спільнотою, у тому числі й на Україні. Рівень захворюваності туберкульозом в Україні в 8–10 разів перевищує показники розвинених країн [1, 2]. З 2000 року боротьба з туберкульозом й ВІЛ/СНІДом визначена як одне з первинних державних завдань і один з пріоритетних напрямів державної політики в соціальній сфері [3]. Особливе значення проблема зросту захворювання на туберкульоз має у аспекті впливу ВІЛ-асоційованого туберкульозу на прогресування перебігу ВІЛ та смертність хворих на ВІЛ/СНІД [4]. У всьому світі туберкульоз має більше значення в захворюваності і смертності ВІЛ-інфікованих, чим усі інші опортуністичні інфекції (ЮНЭЙДС, 2003). Майже третина