

УДК [616.36-002.12:578.891]-053.2-074

Активность тканевых ферментов печени и лимфоцитов периферической крови у детей с хроническим гепатитом В

В.Г. Булыгин¹, Н.А. Аксенова², Г.В. Булыгин^{1,2}¹НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН,²Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого)

Activity of tissue enzymes of the liver and peripheral blood lymphocytes at children with chronic hepatitis B

V.G. Bulygin, N.A. Aksenova, G.V. Bulygin

Цель исследования. Изучение показателей активности ферментов в ткани печени и лимфоцитах крови детей, больных хроническим вирусным гепатитом В (ХВГ В).

Материал и методы. Обследованы 20 детей 12–15 лет, больных ХВГ В: 10 – со 2-й стадией хронизации процесса и 10 – с 3-й стадией. В ткани печени, полученной при прицельной биопсии, и в выделенных из крови лимфоцитах определялась активность метаболических ферментов биолюминесцентным методом.

Результаты. Реакции метаболизма в ткани печени детей зависят от стадии хронизации процесса, причем при 3-й стадии функциональное поражение клеток печени более глубокое. Метаболизм лимфоцитов зависел также от тяжести процесса, при этом у детей с 3-й стадией хронизации имела место более выраженная функциональная депрессия лимфоцитов.

Выводы. Интенсивность реакций метаболизма в клетках печени и лимфоцитах у детей 12–15 лет, больных ХВГ В, зависит от стадии хронизации инфекционного процесса и при 3-й его стадии отмечаются более глубокие, чем при 2-й, поражения клеток печени и лимфоцитов. Характер соотношения ферментных показателей печени и лимфоцитов позволяет утверждать, что последние отражают специфику и направленность изменений метаболических процессов в ткани печени.

Ключевые слова: дети, хронический вирусный гепатит В, стадии хронизации, печень, лимфоциты, ферменты, метаболизм.

Aim of investigation. To study parameters of activity of liver tissue enzymes and blood lymphocytes in children with *chronic viral hepatitis B* (CVH B).

Material and methods. 20 patients with CVH B in the age of 12 to 15 years were investigated: 10 children – with the 2-nd stage of process chronization and 10 – with the 3-rd stage. In liver tissue obtained at guided biopsy, and in lymphocytes discharged from blood activity of metabolic enzymes was determined by bioluminescent method.

Results. Metabolic reactions in liver tissue of children depend on stage of chronization of process, at the 3-rd stage the functional lesion of liver cells it is more profound. Metabolism of lymphocytes in children depend on severity of disease as well, thus at children with the 3-rd stage of chronization more severe functional depression of lymphocytes took place.

Conclusions. Intensity of reactions of metabolism of liver cells and lymphocytes in 12–15 years old children with CVH B, depends on stage of chronization of infectious process. Lesions of liver cells and lymphocytes are more profound at the 3-rd stage, than at the 2-nd. Pattern of interrelation of enzyme scores of the liver and lymphocytes allows to postulate, that the latter reflect specificity and orientation of metabolic changes in liver tissue.

Key words: children, chronic viral hepatitis B, stages of chronization, the liver, lymphocytes, enzymes, metabolism.

Булыгин Вадим Геннадьевич – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы цитологии лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН; контактная информация для переписки – bulyginvadim@mail.ru, bulyginvadim@rsimpnscn.ru

Аксенова Нина Андреевна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры детской хирургии Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Булыгин Геннадий Викторович – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, профессор кафедры клинической иммунологии Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого

Хронический вирусный гепатит В (ХВГ В) с точки зрения распространенности и тяжести заболевания в течение многих лет остается одной из наиболее актуальных проблем для инфекционной патологии и гепатологии во всем мире, в том числе в Российской Федерации [2, 3, 11, 13]. Особенно остро стоит этот вопрос в педиатрической практике, так как является одним из факторов детской инвалидности [10].

Трактовка лишь клинических признаков не может служить надежным критерием при оценке тяжести ХВГ В вследствие неспецифичности и слабой выраженности симптоматики. Исследование внутриклеточных процессов, протекающих в организме при данной патологии, позволит усовершенствовать применяемые на сегодняшний день методы лечения, сделать их более обоснованными с точки зрения патогенеза и тем самым облегчить течение и отдалить неблагоприятные исходы болезни.

В настоящее время доказано, что в патогенезе ХВГ В важная роль принадлежит иммунной системе, ее способности к распознаванию возбудителя и дальнейшему формированию полноценного иммунного ответа, завершающегося инактивацией и элиминацией микробного агента [9]. Физиологической единицей, в первую очередь контактирующей с микроорганизмом, является иммунокомпетентная клетка, функциональное состояние которой и обуславливает адекватность реагирования. Проявление в полном объеме функциональных возможностей лимфоцитов, как и любой другой клетки организма, в значительной степени определяется ее внутриклеточным метаболизмом, обеспечиваемым определенным уровнем активности ферментов [1].

Несмотря на многочисленные исследования и на достигнутые успехи, многие вопросы рассматриваемой инфекции еще не нашли своего окончательного решения. Одним из них является изучение особенностей метаболических изменений в детском организме при ХВГ В, зависящих от стадии его хронизации. Использование энзиматических параметров, определяемых в ткани печени при разных стадиях хронизации, и характер их соотношения с аналогичными показателями лимфоцитов при данном заболевании позволит, на наш взгляд, дать оценку изменениям метаболизма в печеночной ткани, так как известно, что внутриклеточный обмен в лимфоцитах способен отражать указанные процессы целостного организма [5]. В доступной литературе практически нет сведений о результатах подобных исследований.

В связи с изложенным **целью** наших исследований явилось изучение показателей активности ферментов в ткани печени и общей популяции лимфоцитов периферической крови у детей, больных хроническим вирусным гепатитом В, и определение зависимости этих параметров от стадии хронизации заболевания.

Материал и методы исследования

Обследованы 20 детей в возрасте от 12 до 15 лет с диагнозом «хронический вирусный гепатит В», который устанавливался в условиях специализированного стационара с помощью набора стандартных клинико-биохимических и иммуноферментных методов исследования и подтверждался морфологически при пункционной биопсии печени (под контролем УЗИ) с учетом гистологического индекса степени активности, а также гистологического индекса стадии хронизации – по полуколичественной системе баллов В.В. Серова [7], основанной на принципах, предложенных R.G. Knodell и соавт. [14]. Из общего числа обследованных детей у 10 определена 2-я стадия хронизации процесса (слабая или умеренная степень активности заболевания с умеренно выраженными фиброзными изменениями в печени) и еще у 10 – 3-я стадия (слабая или умеренная степень активности с тяжелым фиброзом в печени).

Материал, полученный при биопсиях, использовался и для определения в ткани печени активности внутриклеточных ферментов. Для этого был применен биолюминесцентный метод А.А. Савченко и Л.Н. Сунцовой [6], модифицированный нами. Определялись следующие показатели: активность *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы* (Г6ФДГ), *глицерол-3-фосфатдегидрогеназы* (ГЗФДГ), *лактатдегидрогеназы* (ЛДГ), *НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ* (НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ), *НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ* (НАДГДГ и НАДФГДГ), *НАД- и НАДФ-зависимых малатдегидрогеназ* (НАДМДГ и НАДФМДГ), а также *глутатионредуктазы* (ГР). Активность ферментов выражалась в микроединицах на 1 микрограмм ткани печени (мкЕ/мкг).

Перечисленные показатели были изучены и в лимфоцитах, выделенных из венозной крови больных на градиенте плотности (1,077 г/мл) фиколевораграфа [12]. Активность ферментов в лимфоцитах выражалась в мкЕ на 10 000 клеток.

Достоверность различий между уровнями активности внутриклеточных ферментов в группах с разными стадиями хронизации инфекционного процесса оценивалась с помощью *t*-критерия Стьюдента [4, 8]. Математическая обработка полученных результатов проводилась на компьютерах класса IBM с использованием пакетов прикладных программ.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования выявлены достоверные различия между ферментными показателями ткани печени в группах больных, различающихся

по стадии хронизации инфекционного процесса (табл. 1).

Так, например, активность Г6ФДГ и ГР в группе детей с 3-й стадией хронизации гепатита была на достоверно менее высоких уровнях, чем при 2-й стадии хронизации процесса. Кроме того, выявлена тенденция к снижению показателя ЛДГ в группе с более высокой стадией хронизации гепатита по сравнению с аналогичным параметром печеночной паренхимы при 2-й стадии хронизации. В свою очередь, уровень НАДИЦДГ при 3-й стадии хронизации определялся достоверно более высоким, чем при 2-й стадии.

Уменьшение активности двух НАДФ-зависимых ферментов – Г6ФДГ и ГР – у детей с более тяжелой стадией заболевания свидетельствует о значительном снижении функциональных возможностей клеток печени вследствие ограничения наработки субстратов для макромолекулярного синтеза, а также о менее высоком уровне в них реакций глутатионовой системы антиоксидантной защиты. Учитывая роль НАДФ в синтетических процессах, в том числе липидном обмене, связанном с обновлением и восстановлением мембранных структур, можно предположить, что уменьшение его количества в результате ингибирования реакций с участием указанных ферментов способствует ограничению репаративных процессов в ткани печени при ХВГ В.

Повышение же активности НАДИЦДГ может свидетельствовать об интенсификации реакций цикла трикарбоновых кислот и усиленной выработке аденозинтрифосфата, потребность клеток в котором в условиях патологического процесса увеличена. Однако участие гликолиза во внутриклеточной энергопродукции при более тяжелой стадии гепатита В, вероятно, ограничено, что может способствовать накоплению в клетках лак-

тата и подтверждается менее высокой, чем при 2-й стадии, активностью ЛДГ.

Таким образом, установлены некоторые особенности метаболических реакций, протекающих в паренхиме печени детей, больных хроническим вирусным гепатитом В. Выявлено, что у них интенсивность реакций метаболизма в печеночной ткани зависит от стадии хронизации инфекционного процесса. Изменения метаболических параметров, выявляемые при 3-й стадии хронизации, свидетельствуют о более глубоком, чем при 2-й стадии, функциональном поражении клеток печени.

При сравнении энзиматических параметров лимфоцитов в группах детей, отличающихся по стадии хронизации инфекционного процесса, также выявлен ряд достоверных различий между исследованными показателями. Активность значительного числа ферментов лимфоцитов (Г6ФДГ, ЛДГ, НАДФИЦДГ, НАДМДГ и ГР) у детей с 3-й стадией хронизации ХВГ В была в несколько раз менее высокой, чем у детей со 2-й стадией хронизации (табл. 2).

Изменения активности ферментов позволяют оценить особенности метаболизма в иммунокомпетентных клетках, ассоциированные со стадией хронизации гепатита В. Так, снижение активности НАДФИЦДГ в лимфоцитах детей с 3-й стадией хронизации процесса свидетельствует о меньшем количестве субстратов, поступающих из цитозоля клеток на начальные этапы цикла трикарбоновых кислот, по сравнению с детьми, у которых морфологически установлена 2-я стадия хронизации. Кроме того, у детей с 3-й стадией в большей степени ингибированы и реакции заключительного этапа цикла Кребса – весьма существенно снижено количество малата, сохраняющегося в цикле трикарбоновых кислот, на что указывает уменьшение активности НАДМДГ.

В то же время участие гликолиза во внутриклеточной энергопродукции лимфоцитов при более тяжелом хроническом гепатите В ограничено, что подтверждается менее высокой, чем при 2-й стадии, активностью ЛДГ.

Уменьшение активности Г6ФДГ и ГР у детей с более тяжелой стадией заболевания свидетельствует о значительном снижении функциональных возможностей лимфоцитов при данной патологии за счет ограничения наработки субстратов для макромолекулярного синтеза и пролиферативной активности клеток, а также о менее высоком уровне в них антиоксидантной защиты.

Установленные в результате исследования особенности метаболизма лимфоцитов в группах, различающихся по стадии хронизации вирусного гепатита В, выявили четко выраженную зависимость уровня энзиматических показателей этих иммунокомпетентных клеток от тяжести патологического процесса. Изменения метаболических параметров, отмечаемые при 3-й стадии

Таблица 1

Активность ферментов (мкЕ/мкг)
в ткани печени детей, больных ХВГ В ($M \pm m$)

Фермент	Стадия хронизации	
	2-я, n=10	3-я, n=10
Г6ФДГ	25,79±5,86	5,53±1,09*
Г3ФДГ	139,26±46,21	114,98±15,78
ЛДГ	17,49±4,19	8,43±3,17**
НАДИЦДГ	0,88±0,29	2,33±0,63***
НАДФИЦДГ	17,47±3,99	17,95±3,23
НАДГДГ	126,15±36,03	202,92±56,06
НАДФГДГ	4,80±2,17	4,76±1,39
НАДМДГ	116,94±35,55	84,07±19,27
НАДФМДГ	16,20±7,97	14,87±8,19
ГР	4,54±0,68	2,23±0,13*

*p<0,01, **p<0,1, ***p<0,05

Таблица 2
Активность ферментов (мкЕ/10 000 клеток)
в лимфоцитах периферической крови детей,
больных ХВГ В (M±m)

Фермент	Стадия хронизации	
	2-я, n=10	3-я, n=10
Г6ФДГ	2,01±0,53	0,11±0,04*
Г3ФДГ	58,93±10,71	114,81±45,48
ЛДГ	3,76±0,94	0,08±0,03**
НАДИЦДГ	1,03±0,38	0,69±0,21
НАДФИЦДГ	6,73±1,78	1,43±0,51*
НАДГДГ	48,74±12,36	57,32±14,35
НАДФГДГ	3,57±0,89	4,61±1,65
НАДМДГ	38,47±9,44	15,21±5,53***
НАДФМДГ	3,98±1,06	6,42±2,12
ГР	7,83±2,55	1,97±0,63***

*p<0,01, **p<0,001, ***p<0,05

хронизации, можно расценить как свидетельство еще более глубокой, чем при 2-й стадии, функциональной депрессии лимфоцитов, что, вероятно, сказывается на эффективности иммунного ответа при данной патологии, адекватность которого зависит от степени тяжести заболевания.

В заключение можно отметить, что выявленные в результате наших исследований особенности внутриклеточного обмена, характерные для клеток печени и лимфоцитов, в зависимости от стадии хронизации вирусного гепатита В у детей 12–15 лет и проводимые в этом направлении дальнейшие исследования позволят, по-наше-

му мнению, уточнить некоторые метаболические аспекты патогенеза ХВГ В, обусловленные тяжестью его течения, определить новые подходы к диагностике и лечению указанного заболевания.

Выводы

1. Интенсивность реакций метаболизма в печеночной ткани у детей в возрасте 12–15 лет, больных хроническим вирусным гепатитом В, зависит от стадии хронизации инфекционного процесса. Изменения метаболических параметров, выявляемые при 3-й стадии хронизации, свидетельствуют о более глубоком, чем при 2-й стадии, функциональном поражении клеток печени.

2. В лимфоцитах крови детей 12–15 лет, больных хроническим вирусным гепатитом В, интенсивность и характер метаболических реакций также зависят от тяжести заболевания и более выражены при 3-й стадии его хронизации.

3. Как в клетках печени, так и в выделенных из венозной крови лимфоцитах наблюдаются однонаправленные изменения активности ряда энзиматических показателей, обусловленные стадией хронизации заболевания. Характер соотношения активности ферментов в клетках печени с уровнями активности этих ферментов в лимфоцитах крови позволяет утверждать, что энзиматические параметры лимфоцитов отражают специфику и направленность изменений метаболических процессов, происходящих в ткани печени детей при хроническом вирусном гепатите В.

Список литературы

1. Булыгин Г.В., Камзалакова Н.И., Андрейчиков А.В. Метаболические основы регуляции иммунного ответа. — Новосибирск: Изд-во СО РАМН, 1999. — 346 с.
2. Галимова С.Ф., Надинская М.Ю., Маевская М.В. Хронический гепатит В: факторы риска и лечение // Клин. перспективы гастроэнтерол. гепатол. — 2001. — № 4. — С. 2–7.
3. Каганов Б.С. Вирусный гепатит В: достижения и проблемы // Рос. педиатр. журн. — 1998. — № 1. — С. 50–60.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 351 с.
5. Нарциссов Р.П., Степанова Е.И. Проблемы прогнозирования здоровья детей // Медицина и здравоохранение (Серия: охрана материнства и детства): обзорная информация. — М., 1987. — 36 с.
6. Савченко А.А., Суницова Л.Н. Высококчувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови человека биоломинесцентным методом // Лабор. дело. — 1989. — № 11. — С. 23–25.
7. Серов В.В. О современной классификации хронического гепатита // Врач. — 1998. — № 7. — С. 10–12.
8. Славин М.В. Методы системного анализа в медицинских исследованиях. — М.: Медицина, 1989. — 304 с.
9. Тихонова Е.П., Булыгин Г.В. Метаболические основы иммунореактивности при парентеральных гепатитах В и С. — Новосибирск: Наука, 2003. — 148 с.
10. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Чередниченко Т.В. Вирусные гепатиты от А до ТТV у детей. — М.: Новая волна, 2003. — 432 с.
11. Шахгильдян И.В., Ясинский А.А., Михайлов М.И. и др. Хронические вирусные гепатиты в Российской Федерации // Клинико-эпидемиологические и этноэкологические проблемы заболеваний органов пищеварения: Материалы VIII Восточно-Сибирской гастроэнтерол. конф. с междунар. участием и Красноярской краевой гастроэнтерол. конф. 17–18 апреля 2008 г. — Красноярск, 2008. — С. 246–253.
12. Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes // Tissue Antigens. — 1974. — Vol. 4. — P. 250–260.
13. Chisari F.V., Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis // Annu. Rev. Immunol. — 1995. — N 13. — P. 29–60.
14. Knodell R.G., Baptista A., Bianchi L. et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis // J. Hepatol. — 1995. — Vol. 22. — P. 696–699.