

КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИСТАТИНА С В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ И ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

Наталья Борисовна ВОЛОШИНА¹, Татьяна Григорьевна ФИЛАТОВА², Валентина Сергеевна КРАПИВКИНА^{2, 3}, Юлия Валерьевна ЮЗЬКО², Татьяна Александровна КОРОЛЕНКО²

¹ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава
630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

²ГУ НИИ физиологии СО РАМН,
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

³МУЗ городская клиническая больница № 7
630005, г. Новосибирск, ул. Ольги Жилиной, 90 а

Цистатин С — негликозилированный катионный белок с молекулярной массой 13,3 кДа, принадлежащий к суперсемейству цистатина, основная функция которого заключается в регуляции активности цистеиновых протеаз. Обнаружено достоверное повышение концентрации цистатина С в сыворотке крови у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (неалкогольным стеатозом и стеатогепатитом) и хроническим гепатитом С по сравнению с практически здоровыми донорами, что, по-видимому, является отражением повышенной секреции цистатина С стимулированными макрофагами. Достоверных различий в концентрации цистатина С у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и хроническим гепатитом С не выявлено, что, вероятно, обусловлено единством патогенетической роли ингибитора протеаз в развитии воспаления.

Ключевые слова: цистатин С, неалкогольный стеатоз и стеатогепатит.

Морфологические изменения печени в виде стеатоза у пациентов, употребляющих большое количество алкоголя, описаны в середине прошлого столетия. В 1957 году Н. Thaler выявил стеатоз печени у больных сахарным диабетом, не употребляющих алкогольные напитки [1]. В 1980 году J. Ludwig предложил использовать термины «неалкогольный стеатоз» и «неалкогольный стеатогепатит» для того, чтобы подчеркнуть отсутствие связи наличия патологии печени и приема алкоголя [2]. Патогенез первичной неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) до конца не изучен; согласно современным представлениям о НАЖБП, включающей в себя стеатоз печени, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), фиброз и цирроз печени, он связан с инсулинорезистентностью, которая является важной составляющей метаболического синдрома. В качестве современной модели патогенеза НАЖБП предложена теория «двух ударов», или этапов: инсулинорезистентность — первый удар, приводящий к развитию стеатоза печени; второй удар — в виде окислительного стресса — ответственен за стеатогепатит [3].

НАСГ часто протекает «субклинически», не имеет четкой клинической картины, диагностируется после «случайного» обнаруже-

ния повышения активности аминотрансфераз сыворотки крови и исключения других заболеваний печени [4–6]. Однако несмотря на латентное течение НАСГ, маску «безобидного» заболевания, известно, что до 25% случаев криптогенного цирроза печени обусловлены стеатогепатитом [6]. Согласно исследованию А. Propst и соавт. 1995 года, ожидаемая продолжительность жизни у больных НАСГ не ниже, чем у здоровых лиц соответствующего возраста и пола [7]. Показано, что приблизительно у 50% больных НАСГ развивается фиброз печени и почти у 17% — цирроз печени [8].

В настоящее время не выявлены клинические, лабораторные, морфологические критерии, позволяющие прогнозировать течение НАСГ, выявлять пациентов с прогрессирующим течением заболевания. Подтверждением диагноза НАЖБП может служить пункционная биопсия печени, которая позволяет определить стадию развития заболевания, выявить наличие фиброза и цирроза печени. Тем не менее динамическое наблюдение за фиброзом с помощью биопсии затруднено ввиду ее инвазивности, ограничений, связанных с наличием у пациентов противопоказаний для проведения процедуры, зависимости от квалификации мор-

Волошина Н.Б. — д.м.н., проф. каф. пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета, e-mail: navo@ngs.ru
Филатова Т.Г. — зав. клинической лаборатории

Крапивкина В.С. — врач-терапевт, МУЗ ГКБ №7; аспирант, ГУ НИИ физиологии СО РАМН

Юзько Ю.В. — канд.м.н., н.с. лаб. клеточной биохимии и физиологии

Короленко Т.А. — д.м.н., проф., зав. лаб. клеточной биохимии и физиологии

фолога. В связи с этим все большее значение приобретает поиск неинвазивных маркеров развития фиброза печени [9, 10].

Из прямых методов оценки плотности печени наибольшее распространение получила ультразвуковая эластография печени (УЭП) с помощью аппарата FibrosScan (EchoSens, Франция), однако этот метод обладает низкой чувствительностью в разграничении стадий фиброза, особенно в верификации минимального фиброза [11].

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, α_2 -макроглобулин, ингибиторы цистеиновых протеаз, росттрансформирующий фактор β (TGF- β), простагландин F (PGF), а также лизосомные ферменты сыворотки крови [10, 12]. Особое внимание привлекает новая, относительно недавно открытая группа эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз— цистатины [13–18].

Цель исследования. Изучение концентрации ингибитора цистеиновых протеаз—цистатина С— в сыворотке крови у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (стеатозом, стеатогепатитом) и хроническим гепатитом С.

Материалы и методы

Концентрация цистатина С определена у 39 пациентов с НАЖБП (29 пациентов с неалкогольным стеатозом печени, средний возраст $59,6 \pm 1,8$ лет, и 10 пациентов с неалкогольным стеатогепатитом, средний возраст $56,5 \pm 5,4$ лет) и у 11 человек с хроническим гепатитом С (средний возраст $52 \pm 6,3$ лет). У 8 больных НАЖБП при ультразвуковом исследовании выявлены признаки, характерные для фиброза печени, у 3 из них фиброз печени подтвержден при пункционной биопсии печени. Контрольная группа состояла из 17 практически здоровых доноров. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской Декларации (2000 г.).

Всем больным произведено тщательное обследование для исключения других причин поражения печени— аутоиммунного гепатита, хронических холестатических заболеваний печени и пр.

Диагноз хронический гепатит с подтвержден на основании данных иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), выявляе-

нием РНК вируса гепатита с методом полимеразной цепной реакции, в 3 случаях— при пункционной биопсии печени.

Активность аланиновой аминотрансферазы (АЛТ) и аспарагиновой аминотрансферазы (АСТ) определяли с помощью наборов ЗАО «Вектор-Бест» колориметрическим динитрофенилгидразиновым методом по Райтману, Френкелю; содержание общего билирубина— с использованием модифицированного метода Йендрашека— Грофа. Активность щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидаза— с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» кинетическим методом (спектрофотометр с проточной кюветой РМ-760, Германия).

Концентрацию цистатина С в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием коммерческих наборов Biovendor (Чехия) для количественного определения цистатина С человека. Экстинкцию образцов оценивали с помощью планшетного ридера (MULTISKAN EX Thermo Electron Corp., Финляндия) при 450 нм. Результаты представляли в виде общей концентрации цистатина С в расчете на 1 мл биологического образца (нг/мл).

Индекс инсулинорезистентности рассчитывали по формуле HOMA IR: (концентрация инсулина мкЕД/мл \times концентрация глюкозы ммоль/л):22,5. Значение больше 2,27 рассматривалось как наличие инсулинорезистентности [19].

Диагноз НАЖБП подтвержден ультразвуковым исследованием печени. При ультразвуковом исследовании помимо стеатоза у 9 пациентов обнаружена умеренная гепатомегалия (не более 2 см).

У всех пациентов НАЖБП диагностирован метаболический синдром согласно критериям, рекомендованным экспертами Национального института здоровья США (АТР_{III} / NCEP 2001) [20]. У всех больных выявлен абдоминальный тип ожирения. Избыточная масса тела верифицирована у 19 человек (индекс массы тела ИМТ $28,5 \pm 0,68$ баллов); у 5 пациентов выявлено ожирение 1 степени (ИМТ $32,9 \pm 0,45$ баллов), у 8— 2 степени (ИМТ $37,9 \pm 0,9$ баллов), у 7— 3–4 степени (ИМТ $48,1 \pm 1,9$ баллов).

Уровень гликемии натощак у 29 пациентов не превышал 6 ммоль/л ($4,8 \pm 0,1$ ммоль/л), у 10 человек уровень сахара в крови был несколько повышен ($6,6 \pm 0,2$ ммоль/л). Средние показатели содержания инсулина натощак (норма 4–25 мкЕД/мл) составили $14,7 \pm 6,08$ мкЕД/мл, у 1 пациента уровень инсулина был повышен

(55,0 мкЕД/мл) и у 1 — снижен (1,8 мкЕД/мл). Значение НОМА IR были повышены у 18 человек, составив в среднем $4,1 \pm 0,3$, у 11 не превышали нормальных величин ($1,7 \pm 0,2$).

Средние показатели систолического артериального давления составили $150,6 \pm 3,9$ мм рт. ст., диастолического — $92,0 \pm 1,8$ мм рт. ст.

Синдром цитолиза выявлен у 10 человек с НАЖБП (активность ферментов цитолиза не выше 3 норм): активность АЛТ у них в среднем составила $1,13 \pm 0,12$ мкмоль/л (норма 0,1–0,68 мкмоль/л), АСТ — $0,77 \pm 0,05$ мкмоль/л (норма 0,1–0,45 мкмоль/л), то есть имелись признаки стеатогепатита. Маркеры холестаза — активность щелочной фосфатазы (норма 70–200 ЕД/л) и гамма-глутамилтранспептидазы (норма 0,25–1,77 ЕД/л) были незначительно повышены соответственно у 7 ($243,6 \pm 36,8$ ЕД/л) и у 3 человек ($13,1 \pm 1,9$ ЕД/л).

Активность АЛТ в сыворотке крови у 8 больных хроническим вирусным гепатитом С была повышена ($1,08 \pm 0,40$ мкмоль/л), у 3 пациентов — не изменена ($0,45 \pm 0,15$ мкмоль/л).

Статистическая обработка материала производилась при помощи пакета программ SPSS 11,5. Вычисляли среднее арифметическое значение M , ошибку среднего арифметического m (результаты представлены в виде $M \pm m$), коэффициент корреляции Спирмена, 95%-й доверительный интервал (95% CI).

Результаты исследования. Выявлена прямая достоверная корреляционная зависимость концентрации цистатина С в сыворотке крови от наличия у пациентов НАЖБП (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,554$; $p = 0,0001$). У больных со стеатозом печени и стеатогепатитом концентрация цистатина С в сыворотке крови достоверно выше, чем у практически здоровых доноров. Так, у пациентов со стеатозом печени концентрация цистатина с сыворотки крови составила $1728,9 \pm 118,3$ нг/мл, в то время как у доноров — $1000,0 \pm 125,6$ нг/мл (95% CI 361,7–1096,2; $p = 0,0001$). Подобная закономерность прослежена и у пациентов со стеатогепатитом, концентрация цистатина С

у которых составила $1553,0 \pm 147,1$ нг/мл (95% CI 147,1–963,0; $p = 0,01$) (табл.). Методом логистического регрессионного анализа определен высокий шанс повышения концентрации цистатина с в сыворотке крови у пациентов НАЖБП (отношение шансов OR 15,5; 95% CI 3,6–66,5; $\chi^2 = 13,7$; $p = 0,00001$).

Обнаружена прямая достоверная корреляционная зависимость концентрации цистатина С в сыворотке крови от наличия у пациентов с НАЖБП фиброза печени (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,338$; $p = 0,015$). У пациентов с признаками фиброза печени концентрация цистатина с сыворотки крови была достоверно выше, чем у больных без фиброза, соответственно $2134,4 \pm 204,3$ и $1567,6 \pm 99,3$ нг/мл (95% CI 64,2–1069,3; $p = 0,03$).

Подобные закономерности получены при исследовании концентрации цистатина С у пациентов с хроническим гепатитом С. Обнаружено повышение содержания цистатина С в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С по сравнению с донорами, соответственно $1914,5 \pm 309,9$ и $1000,0 \pm 125,6$ нг/мл (95% CI 194,0–1635,1; $p = 0,004$). Отмечена прямая достоверная корреляционная зависимость между повышенной концентрацией цистатина С в сыворотке крови и наличием у них хронического гепатита С (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,815$; $p = 0,001$).

Сопоставление концентрации цистатина С в сыворотке крови у пациентов НАЖБП и хроническим гепатитом С не выявило достоверных отличий ($p = 0,345$).

Известно, что функция цистатина С, низкомолекулярного белка, обнаруженного в различных типах клеток (макрофагах, гепатоцитах и пр.), заключается в регуляции активности цистеиновых протеаз — катепсинов В, L, Н, S и К, ответственных за обеспечение защиты клеток и тканей от повреждающего действия лизосомных протеаз. Лизосомные протеазы освобождаются во внешнюю среду при гибели клеток или при секреции опухолевыми клетками в процессе инвазии опухолей [17].

Таблица
Концентрация цистатина С в сыворотке крови у больных НАЖБП, хроническим гепатитом С и доноров

Группы обследованных пациентов	Концентрация цистатина С (нг/мл)	95 % CI	p (сравнение с группой доноров)
Доноры (n = 17)	$1000,0 \pm 125,6$		
Стеатоз печени (n = 29)	$1728,9 \pm 118,3$	361,7–1096,2	0,0001
Стеатогепатит (n = 10)	$1553,0 \pm 147,1$	147,1–963,0	0,01
Хронический гепатит С (n = 11)	$1914,5 \pm 309,9$	194,0–1635,1	0,004

Биологическая роль цистатинов в патологии печени изучена недостаточно [17, 21–23]. Согласно гипотезе, нарушения соотношения «протеазы и их ингибиторы» и следующий за этим неконтролируемый протеолиз наблюдаются при ряде поражений печени, при гепатитах В и С человека, а также в эксперименте у животных с токсическим гепатитом. Выявлено повышение концентрации цистатина С в сыворотке крови больных с гепатитами В и С, более значительное при развитии фиброза печени, что позволяет рассматривать показатель среди возможных неинвазивных сывороточных маркеров фиброза, связанных с функционированием клеток соединительной ткани [18].

Основным местом катаболизма белка и действия цистатина С являются почки, так как более 99% белков выводится из циркуляции при гломерулярной ультрафильтрации и реабсорбции в трубках. Интенсивно изучается диагностическая роль цистатина С как раннего показателя нарушения функции почек. Определение концентрации цистатина С в сыворотке крови предлагается в качестве более надежного критерия при выявлении нарушений клубочковой фильтрации при различных заболеваниях почек (отмечены преимущества по сравнению с оценкой по уровню креатинина). У всех пациентов обследованной группы с НАЖБП и ХВГ с биохимических и клинических признаков почечной недостаточности не было, уровень креатинина сыворотки крови был в пределах нормы.

Выявленное нами повышение концентрации цистатина С в сыворотке крови у больных НАЖБП по сравнению с практически здоровыми донорами отражает участие этого ингибитора цистеиновых протеаз в процессе воспаления в печени, что, по-видимому, является отражением повышенной секреции цистатина С стимулированными макрофагами. Отсутствие достоверных различий в концентрации цистатина С у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и хроническим гепатитом С, вероятно, обусловлено единством патогенетической роли ингибитора протеаз в развитии воспалительных процессов в печени и не позволяет провести дифференциальную диагностику между этими заболеваниями. Представляется перспективным дальнейшее исследование концентрации цистатина С у пациентов с НАЖБП в различные стадии ее развития (стадии фиброза и цирроза печени).

Литература

1. Thaler H. Leberkrankheiten: Histologie; Klinik. Berlin; Heidelberg; N. Y.: Springer-Verlag, 1982. 456 s.
2. Ludwig J., Viggiano T.R., McGill D.B., Oh B.J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease // Mayo Clin. Proc. 1980. 55. 434–438.
3. Perez-Fguilar F. Ethioopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis // Gastroenterol. Hepatol. 2005. 28. (7). 396–406.
4. Bloomgarden Z.T. Insulin resistance syndrome and nonalcoholic fatty liver disease // Diabetes Care. 2005. 28. 1518–1523.
5. de Mura M.K. Неалкогольный стеатогепатит // Клин. перспект. гастроэнтерол., гепатол. 2001. (3). 12–16.
6. de Mura M.K. Nonalcoholic steatohepatitis // Klin. perstpekt. gastroenterol., hepatol. 2001. (3). 12–16.
7. Yu A.S., Keeffe E.B. Nonalcoholic fatty liver disease // Rev. Gastroenterol. Disord. 2002. 2. (1). 11–19.
8. Propts A., Propts T. Judmaier G., Vogel W. Prognosis in nonalcoholic steatohepatitis // Gastroenterology. 1995. 108. 1607–1615.
9. Ивашкин В.Т., Шульпекова Ю.О. Неалкогольный стеатогепатит // Болезни органов пищеварения. 2000. (2). 41–45.
10. Ivashkin V.T., Shulpekova Y.O. Nonalcoholic steatohepatitis // Bolezni organov pishchevariniya. 2000. (2). 41–45.
11. Takahata T. et al. Cotreatment with interferon-alpha and -gamma reduces liver fibrosis in a rat model // Hepatol. Res. 2004. 28. (3). 146–154.
12. Leroy V., Monier F., Bottari S. et al. 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 // Am. J. Gastroenterol. 2004. 99. 271–279.
13. Павлов Ч.С., Ондос Ш.А., Глушков Д.В., Ивашкин В.Т. Эластометрия в оценке динамики фиброза печени у больных хроническим гепатитом С, леченным пег-интерфероном альфа и рибавирином // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 2008. 18А. 127.
14. Pavlov Ch.S., Ondos Sh.A., Glushenkov D.V., Ivashkin V.T. Elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C cotreatment with peg-interferon-alpha and ribavirin // Ros. zhurn. gastroenterol., hepatol., koloproctol. 2008. 18А. 127.
15. Forns X., Bataller R. Can we indentify liver fibrosis in HCV-infected patients without a liver biopsy? // Curr. Hepatitis Rep. 2003. 2. 146–154.
16. Keppler D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin functions // Cancer Lett. 2006. 235. 159–176.
17. Turk B., Turk D., Salvesen G.S. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators // Curr. Pharm. Des. 2002. 8. 1623–1637.
18. Shi G.-P., Sukhova G.K., Grubb A. et al. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms // J. Clin. Invest. 1999. 104. (9). 1191–1197.

16. Stoka V., Turk B., Turk V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis // *Life*. 2005. Vol. 57 (4/5). P. 347–353.
17. Короленко Т.А., Филатова Т.Г., Черканова М.С. и др. Цистатины: регуляция цистеиновых протеаз и нарушения при опухолевых и воспалительных заболеваниях // *Биомед. химия*. 2008. 54/2. 210–217.
- Korolenko T.A., Filatova T.G., Cherkanova M.S. et al. Cystatins: cysteine proteases regulation and disturbances in tumors and inflammation // *Biomed. khimiya*. 2008. 54/2. 210–217.
18. Юзько Ю.В. Изменения различных классов протеаз и ингибиторов протеаз как возможных сывороточных маркеров фиброза у больных хроническим гепатитом С: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2007.
- Yuzko Y.V. Changes of different proteases classes and inhibitors proteases as a fibrosis seromarker of chronic HCV: Avtoreferat, thesis, Candidate of Medical Science. Novosibirsk, 2007.
19. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man // *Diabetologia*. 1985. 28. 412–419.
20. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) // *JAMA*. 2001. 285. (19). 2486–2497
21. Abrahamson M., Alvares-Fernandez M., Nathanson C.-M. Cystatins // *Biochem. Soc. Symp.* 2003. 70. 179–199.
22. Filler G., Bokenkamp A., Hofmann W. et al. Cystatin C as a marker of CFR—history, indications, and future research // *Clin. Biochem.* 2006. 38. 1–8.
23. Sarnak M.J., Katz R., Stehman-Breen C. et al. Cystatin C concentration as a risk factor for heart failure in older adults // *Ann. Intern. Med.* 2005. 142. 497–505.

CYSTATIN C CONCENTRATION IN SERUM OF PATIENTS WITH NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

Natalia Borisovna VOLOSHINA¹, Tatyana Grigorjevna FILATOVA², Valentina Sergeevna KRAPIVKINA^{2,3}, Julia Valer'evna YUZKO², Tatyana Aleksandrovna KOROLENKO²

¹Novosibirsk State Medical University
52, Krasniy prospect, Novosibirsk, 630091

²Research Institute for physiology SB RAMS
4, Timakov str., Novosibirsk, 630117

³Municipal Health Care Institution City Clinical Hospital № 7
90 a, Ol'ga Zhilina str., Novosibirsk, 630005

Cystatin C is endogenous cysteine protease inhibitor belonging to cystatin family, playing the important role in regulation of cysteine protease activity (cathepsins B, L, H, S). Serum cystatin C concentration was measured by ELISA kits for human cystatin C (Biovendor, Czechia) in patients with non-alcoholic steatosis and steatohepatitis (NASH). Comparatively to data obtained in healthy donors increased serum cystatin C level was registered in patients with NASH as result of inflammation and macrophage stimulation.

Keywords: cystatin C, non-alcoholic steatosis and steatohepatiti.

Voloshina N.B. — Doctor of Medical Science, prof., Novosibirsk State Medical University

Filatova T.G. — Head Lab Cell Biochem

Krapivkina V.S. — internist, Municipal Health Care Institution of City clinical Hospital № 7; postgraduate student, State Institute of Physiology Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences

Yuzko Ju.V. — resident, State Institute of Physiology Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences

Korolenko T.A. — Doctor of Medical Science, prof., Head Lab Cell Biochemistry and Physiology, State Institute of Physiology Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences