



**О. П. Фаюра², М. О. Старикович¹,
О. О. Абрагамович², М. О. Абрагамович²,
Р. С. Стойка¹, Ю. Я. Кіт¹**

¹ Відділ регуляції проліферації і апоптозу клітин
Інституту клітинної біології НАН України, м. Львів

² Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького

Спектр ізоформ кортактину в сечі хворих на цироз печінки та їх діагностична цінність як потенційного молекулярного маркера його тяжкості

Вступ. Неінвазивні методи досліджень клінічного стану організму людини набули широкого застосування у медицині як діагностичні та прогностичні тести. Оскільки білковий склад сечі людини тісно асоційований із особливістю функціонування біологічних систем, його якісні та кількісні характеристики є перспективними маркерами контролю різноманітних процесів у організмі [10].

Важливим джерелом пошуку білкових маркерів слугують результати детальної протеоміки (двовимірного електрофорезу білків з наступною мас-спектрометрією) сечі людини залежно від хвороби. Нещодавно під час аналізу білків сечі у хворих на рак молочної залози серед 12 нових білків був виявлений білок SRC8 (субстрат протеїнкінази родини Sarc, або кортактин) [8]. Кортактин належить до білків цитоскелета, асоційованих із актинами, і залучений у процеси утворення ламелоподій, інвадоподій, актинових підклітинних протрузій, асоційованих із деградацією позаклітинного матриксу, а отже, міграції клітин, інвазії пухлини, ендцитозу, міжклітинної взаємодії, діapedезу лейкоцитів і функціонування ендотеліального бар'єра [5–7, 9, 12]. Зокрема, відомо, що дія прооксиданта – пероксиду водню (H_2O_2) – на ендотеліальні клітини пупкової вени людини спричиняє серію внутрішньоклітинних подій, включаючи реорганізацію цитоскелета актину, порушення будови цитоплазми, мембранний блейбінг (утворення бульбашок) і протеїново-тирозинове фосфорилування кортактину, ступінь якого корелює з утворенням мембранних блейбів, зумовлюючи зміну будови ендотеліальних клітин і ендотеліальну дисфункцію [11, 14]. Оксидативний стрес, будучи важливим чинником виникнення ендотеліальної дисфункції, є важливим патогенетичним механізмом виникнення цирозу печінки (ЦП) [15], який часто спостерігається у людей

працездатного віку, призводить до значного зниження якості життя, стійкої втрати працездатності та смерті, що їх часто зумовлюють позапечінкові синтропічні коморбідні ураження [1–3]. Із огляду на це, ми припустили, що в сечі хворих на ЦП різної етіології можуть бути молекулярні форми кортактину різного походження.

Мета дослідження. Дослідити спектр ізоформ кортактину в сечі хворих на ЦП та їх діагностичну цінність як потенційного молекулярного маркера його тяжкості.

Матеріали й методи дослідження. Отримавши письмову згоду на проведення обстеження згідно з принципами Гельсінкської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів України, в рандомізований спосіб із попередньою стратифікацією за наявністю ЦП обстежено 12 хворих (жінки – 41,7 %, чоловіки – 58,3 %) віком $54,8 \pm 2,5$ року, які лікувалися у Львівському обласному гепатологічному центрі, створеному на базі кафедри внутрішньої медицини № 1 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та гастроентерологічного відділу Комунального некомерційного підприємства Львівської обласної ради «Львівська обласна клінічна лікарня». Хворим проведено комплексне клінічно-лабораторне та інструментальне обстеження всіх органів і систем відповідно до вимог сучасної медицини (згідно з Наказом Міністерства охорони здоров'я України від 28.12.2009 р. № 1051 «Про надання медичної допомоги хворим гастроентерологічного профілю», Наказом № 433 від 03.07.2006 р.), на основі результатів якого і поставлено остаточний діагноз. Із цих хворих на ЦП сформовано дослідну групу (ДГ). У шести хворих ЦП був токсико-аліментарного генезу, у одного – С-вірусного, у двох – пер-

винний біліарний, у двох – токсико-аліментарного +С-вірусного, у одного – аутоімунного+токсико-аліментарного. Серед них у восьми хворих виявлено ЦП класу С за Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю (тяжкий), у трьох – класу В за Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю (середньотяжкий), у одного – класу А за Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю (легкий). Контрольну групу (КГ) сформовано з 10 практично здорових осіб відповідних статі й віку, які теж підписали інформовану згоду на проведення обстеження.

У всіх обстежених хворих ДГ і практично здорових осіб КГ забрано по 10,0 мл ранкової порції сечі натще.

Для виявлення кортактину 1,0 мл свіжої сечі центрифугували упродовж 5 хв за 10000 g. До 200,0 мкл надосадової рідини додавали 800,0 мкл ацетону й інкубували упродовж 18 год за -20,0 °С. Білки осаджували центрифугуванням упродовж 10 хв за 10000 g. Осад висушували та розчиняли у дистильованій воді. Білки розділяли за допомогою SDS-електрофорезу з наступним вестерн-блот аналізом із застосуванням моноклональних антитіл зі спорідненістю до кортактину людини (RD system biotechne каталожний номер – MAV6096).

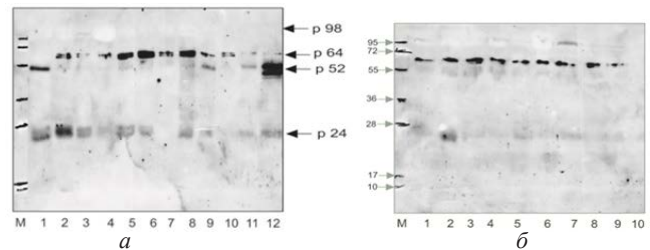
Отримані препарати білків сечі розділяли SDS-електрофорезом у 12,0% PAG [13], переносили з гелю на нітроцелюлозну мембрану для проведення вестерн-блот аналізу. Мембрани блокували (1 год. за 20,0 °С) 5,0% знежиреним молоком у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР), що містить 0,05 % Tween-20. Мембрани промивали ЗФР-Tween-20 тричі по 5 хв, потім інкубували впродовж 18 хв за 4,0 °С із моноклональними антитілами до кортактину. Для ідентифікації імунореактивних білків використовували кон'югати пероксидази хрому з антитілами козла проти імуноглобулінів субкласу Ig G миші у розведенні 1:10000. Імунореактивні білки виявили хемілюмінесцентним аналізом.

Статистичне опрацювання інформації проводили за допомогою програми Microsoft Office Excel 2010, оцінюючи достовірність виявлених змін із застосуванням парного критерію Стьюдента (В. С. Госсета) (різницю вважали вірогідною за $p < 0,05$).

Діагностичну чутливість білка визначали за діагностичною специфічністю, прогностичною значимістю позитивних і негативних результатів, діагностичною ефективністю показника [4].

Результати дослідження та їх обговорення. Результати дослідження 12 зразків сечі хворих на ЦП ДГ і 10 зразків сечі здорових осіб КГ за допомогою вестерн-блот аналізу з використанням моноклональних антикортактинових антитіл представлені на рисунку.

Дослідження спектра імунологічно реактивних білків у зразках сечі 12 хворих на ЦП показало, що у 9 хворих є поліпептид із молекулярною масою 64,0 кДа (рисунк, а, доріжки 2–9), у 4 осіб – білок із молекулярною масою 52,0 кДа (рисунк, а, доріжки 1, 9, 11, 12), у 8 – білок молекулярною масою 24,0 кДа (рисунк, а, доріжки 1–3, 5, 6, 8, 11, 12).



Вестерн-блот аналіз білків сечі хворих на ЦП ДГ (а) і здорових людей КГ (б) з використанням моноспецифічних антикортактинових антитіл (Aviva System Biology).

У здорових осіб КГ імунологічно споріднені з кортактином поліпептиди є з молекулярною масою 98,0, 64,0 і 24,0 кДа. Водночас 9 із 10 зразків сечі здорових людей містили білок із молекулярною масою 64,0 кДа (рисунк, б, доріжки 1–9). Окрім цього білка в одному зі зразків виявлено імунореактивний білок із молекулярною масою 24,0 кДа (рисунк, б, доріжка 2), а в іншому – білок із молекулярною масою 98,0 кДа (рисунк, б, доріжка 7) (див. таблицю).

Характеристика ізоформ кортактину в сечі хворих на цироз печінки дослідної групи та здорових осіб контрольної групи (n, %)

Група	Молекулярні маси ізоформ кортактину			
	24,0 кДа	52,0 кДа	64,0 кДа	98,0 кДа
Дослідна (n = 12)	8 (66,7 %)	4 (33,3 %)	9 (75,0 %)	0 (0,0 %)
Контрольна група (n = 10)	1 (10,0 %)	0 (0,0 %)	9 (90,0 %)	1 (10,0 %)

Порівняльний аналіз отриманих результатів показав, що білок із молекулярною масою 24,0 кДа, виявлений у восьми хворих на ЦП (рисунк, а, доріжки 1–, 5, 6, 8, 11, 12), спостерігається лише в одному з 10 зразків сечі осіб КГ (рисунк, б, доріжка 2), поліпептид із молекулярною масою 64,0 кДа – у дев'яти хворих ДГ (рисунк, а, доріжки 2–9) і дев'яти осіб КГ (рисунк, б, доріжки 1–9), білок із молекулярною масою 98,0 кДа не виявлено у сечі жодної особи ДГ та лише в одній особі КГ (рисунк, б, доріжка 7), білок із молекулярною масою 52,0 кДа – у чотирьох хворих ДГ (рисунк, а, доріжки 1, 9, 11, 12) і в жодній особі КГ.

Білок із молекулярною масою 52,0 кДа, виявлений у хворих ДГ, не фіксували в сечі жодної особи КГ. У чотирьох хворих, у сечі яких ідентифіковано білок із молекулярною масою 52,0 кДа, ЦП був у стадії декомпенсації, клас С за критеріями Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю, на підставі чого можна припустити, що поява цього протеїну в сечі може бути асоційована з наростанням тяжкості ЦП. Діагностична чутливість показника – 33,3 %, діагностична специфічність – 100,0 %, прогностична значимість позитивних результатів – 100,0 %, прогностична значимість негативних результатів – 55,6 %, діагностична ефективність показника – 63,6 %.

Блок із молекулярною масою 24,0 кДа, достовірно частіше виявляли у хворих ДГ (вісім хворих), ніж у осіб КГ (одна особа; $p = 0,0039$). Діагностична чутливість показника – 66,7 %, діагностична специфічність – 90,0 %, прогностична значимість позитивних результатів – 88,7 %, прогностична значимість негативних результатів – 69,2 %, діагностична ефективність показника – 77,3 %. Серед восьми хворих ДГ у шести був ЦП у стадії декомпенсації, клас С за критеріями Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю, у двох – у стадії субкомпенсації, клас В за критеріями Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю.

Діагностична чутливість білка з молекулярною масою 64,0 кДа – 75,0 %, діагностична специфічність – 10,0 %, прогностична значимість позитивних результатів – 50,0 %, прогностична значимість негативних результатів – 25,0 %, діагностична ефективність показника – 45,5 %. Достовірність між показниками ДГ і КГ не виявлено ($p = 0,3726$).

Діагностична чутливість білка з молекулярною масою 98,0 кДа – 0,0 %, діагностична специфічність – 90,0 %, прогностична значимість позитивних результатів – 0,0 %, прогностична значимість негативних результатів – 42,9 %, діагностична ефективність показника – 40,9 %.

Скринінг вмісту білків сечі хворих на ЦП і здорових людей за допомогою вестерн-блот аналізу з використанням комерційних моноклональних антитіл до людського кортактину дав змогу ідентифікувати різні молекулярні форми цього білка в сечі хворих на ЦП і здорових людей. Це свідчить про те, що розподіл молекулярних ізоформ кортактину в сечі може мати діагностичне і/або прогностичне значення у хворих на ЦП. Зокрема, поява протеїнів із молекулярними масами 24,0 і 52,0 кДа у сечі може бути асоційована з наростанням тяжкості ЦП.

Як приклад подаємо короткий опис клінічних випадків – здорової людини, а також хворих класів А, В, С за критеріями Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю з діагнозами, поставленими відповідно до рекомендацій М. Абрагамович et al. [1].

Здоровий. Чоловік, 40 років, працює. За результатами об'єктивного обстеження (інформації з анамнезу життя, алергологічного, спадкового анамнезів, фізикального обстеження) – практично здоровий. Забір сечі для дослідження проведено 31.01.2018 р. Під час дослідження у сечі виявлено білок із молекулярною масою 64,0 кДа.

Хворий 1. Чоловік, 59 років, не працює. ЦП діагностовано у віці 59 років, після двох років уживання алкоголю. Під час обстеження скаржився на ниючий біль у правому підребер'ї, швидку втомлюваність. Із анамнезу життя відомо, що хронічних хвороб не має, упродовж 10 років палить, спадковий і алергологічний анамнези не обтяжені. За результатами комплексного клінічно-лабораторного та інструментального обстеження поставлено діагноз: «Цироз печінки: токсико-аліментарної етіології, із ураженням кровотворної системи (анемія: легкого ступеня, тромбоцитопенія), стадія компенсації, з поступовим наростанням тяж-

кості процесу, клас А за Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю; недостатність травлення: I ступеня». Забір сечі для дослідження проведено 31.01.2018 р. Під час дослідження у сечі виявлено білок із молекулярною масою 64,0 кДа.

Хворий 2. Чоловік, 51 рік, не працює. ЦП діагностовано у віці 51 рік після п'ятирічного вживання алкоголю. Під час обстеження фіксували збільшення живота в розмірах, загальну слабкість. Із анамнезу життя відомо, що хронічних хвороб не має, спадковий і алергологічний анамнези не обтяжені. За результатами комплексного клінічно-лабораторного та інструментального обстеження поставлено діагноз «Цироз печінки: змішаної (токсико-аліментарної, гепатит С-вірусної) етіології, портальна гіпертензія: I ступеня (набряково-асцитичний синдром), із ураженням кровотворної системи (анемія: легкого ступеня, тромбоцитопенія), гепатолієнальним синдромом, зі швидким наростанням тяжкості процесу, стадія субкомпенсації, клас В за Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю; недостатність травлення: I ступеня». Забір сечі для дослідження проведено 06.02.2018 р. Під час дослідження у сечі виявлено білки з молекулярною масою 24,0 і 64,0 кДа.

Хворий 3. Чоловік, 54 роки, не працює. ЦП діагностовано у 54 роки, після 15-річного вживання алкоголю. Через сім місяців у хворого під час обстеження фіксували збільшення живота в розмірах, загальну слабкість, задишку під час звичайного фізичного навантаження, свербіж шкіри, сухість у роті. Із анамнезу життя відомо, що сім місяців тому у пацієнта виявлено гепатит С-вірусну інфекцію. За результатами комплексного клінічно-лабораторного та інструментального обстеження поставлено діагноз: «Цироз печінки: змішаної (токсико-аліментарної, гепатит С-вірусної (фаза реплікації вірусу)) етіології, портальна гіпертензія II ступеня (набряково-асцитичний синдром, варикозне розширення вен стравоходу: I ступеня), з ураженням системи кровотворення (анемія: легкого ступеня), сечовидільної системи (гепаторенальний синдром: II тип), зі швидким наростанням тяжкості процесу, стадія декомпенсації, клас С за Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю; недостатність травлення: I ступеня». Забір сечі для дослідження проведено 31.01.2018 р. Під час дослідження у сечі виявлено білки з молекулярною масою 24,0 і 52,0 кДа.

У всіх хворих на час забору сечі для дослідження спостерігалось погіршення перебігу ЦП. У одного ЦП був алкогольний генезу, у двох – змішаного (алкогольного та гепатит С-вірусного).

Висновки. Дослідження вмісту білків у сечі за допомогою вестерн-блот аналізу з використанням комерційних антитіл до людського кортактину дало змогу ідентифікувати різні молекулярні форми пептидів, які відрізняються у хворих на цироз печінки різної етіології та у здорових людей. Лише в сечі хворих (клас С за критеріями Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю) дослідної групи ідентифікований білок із молекулярною масою 52,0 кДа, білок із молекулярною масою

24,0 кДа достовірно частіше був виявлений у дослідній групі, ніж у контрольній ($p = 0,0039$). Збільшення частоти виявлення протеїнів із молекулярною масою 24,0 кДа та поява протеїнів із молекулярною масою

52,0 кДа у сечі можуть бути асоційовані з виникненням декомпенсованої стадії цирозу печінки. Оцінка їх діагностичної цінності потребує подальших досліджень.

Список літератури

1. Абрагамович МО, Абрагамович ОО. Класифікація цирозу печінки: ретроспективний погляд на проблему та сучасне її вирішення з урахуванням синтропічних ко- та поліморбідних уражень хворого. Медицина транспорту України. 2013;2(46):10–16 (Abrahamovych M, Abrahamovych O. Classification of liver cirrhosis: retrospective view on a problem and its modern solution taking into account the syntropic co- and polymorbide lesions of the patient. Medicine of Ukrainian Transport. 2013;2(46):10-16).
2. Абрагамович ОО, Фаюра ОП, Абрагамович УО. Коморбідність: сучасний погляд на проблему; класифікація (повідомлення перше). Львівський клінічний вісник. 2015;4(12):56–64 (Abrahamovych O, Fayura O, Abrahamovych U. Comorbidity: a Modern View on the Problem; Classification (first notice). Lviv Clinical Bulletin. 2015;4(12):56-64). <https://doi.org/10.25040/lkv2015.04.056>
3. Абрагамович ОО, Фаюра ОП, Абрагамович УО. Коморбідність: сучасний погляд на проблему; класифікація (повідомлення друге). Львівський клінічний вісник. 2016;1(13):31–39 (Abrahamovych O, Fayura O, Abrahamovych U. Comorbidity: a Modern View on the Problem; Classification (second notice). Lviv Clinical Bulletin. 2016;1(13):31-39). <https://doi.org/10.25040/lkv2016.01.031>
4. Андерс А, Стефан Н. Введение в современную эпидемиологию = Introduction to modern epidemiology. МатиРаху; пер. с англ. И. Боня. Таллинн: Ин-т эксперим. и клин. медицины (Эстония), Дат. противорак. о-во, 1996. 122 с. (Anders Album, Stefan Norrel. Introduction to modern epidemiology. Maty Rahu; per. from english I. Bonya. Tallinn: Institute of Experiments. and Clinic. Medicine (Estonia), Dates. 1996. 122 p.)
5. Chen XM, Huang BQ, Splinter PL, Cao H, Zhu G, McNiven MA et al. Cryptosporidium parvum invasion of biliary epithelia requires host cell tyrosine phosphorylation of cortactin via c-Src. Gastroenterology. 2003;125:216-228. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00662-0](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00662-0)
6. Cosen-Binker LI, Kapus A. Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. Physiology (Bethesda). 2006;21:352-361. <https://doi.org/10.1152/physiol.00012.2006>
7. Dudek SM, Jacobson JR, Chiang ET, Birukov KG, Wang P, Zhan X et al. Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase. J Biol Chem. 2004;279:24692-24700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313969200>
8. Gajbhiye A, Dabhi R, Taunk K, Vannuruswamy G, Roy Choudhury S, Adhav R et al. Urinary proteome alterations in HER2 enriched breast cancer revealed by multipronged quantitative proteomics. Proteomics. 2016;16:2403-2418. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600015>
9. García Ponce A, Citalán Madrid AF, Vargas Robles H, Chánez Paredes S, Nava P, Betanzos A et al. Loss of cortactin causes endothelial barrier dysfunction via disturbed adrenomedullin secretion and actomyosin contractility. Sci Rep. 2016;6:29003. <https://doi.org/10.1038/srep29003>
10. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human body fluid proteome analysis. Proteomics. 2006;6(23):6326-6353. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600284>
11. Li Y, Liu J, Zhan X. Tyrosine phosphorylation of cortactin is required for H₂O₂-mediated injury of human endothelial cells. J Biol Chem. 2000;275(47):37187-37193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005301200>
12. MacGrath SM, Koleske AJ. Cortactin in cell migration and cancer at a glance. J Cell Sci. 2012;125(Pt 7):1621-1626. <https://doi.org/10.1242/jcs.093781>
13. Selevsek N, Matondo M, Sanchez Carbayo M, Aebersol R, Domon B. Systematic quantification of peptides/proteins in urine using selected reaction monitoring. Proteomics. 2011;11:1135-1147. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000599>
14. Shentu TP, He M, Sun X, Zhang J, Zhang F, Gongol B. AMPK and SIRT1 Coregulation of Cortactin Contributes to Endothelial Function. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36(12):2358-2368. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307871>
15. Shepard BD, Tuma PL. Alcohol-induced alterations of the hepatocyte cytoskeleton. World J Gastroenterol. 2010;16(11):1358-1365. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i11.1358>

Стаття надійшла до редакції журналу 03.04.2019 р.

Спектр ізоформ кортактину в сечі хворих на цироз печінки та їх діагностична цінність як потенційного молекулярного маркера його тяжкості

О. П. Фаюра, М. О. Старикович, О. О. Абрагамович, М. О. Абрагамович,
Р. С. Стойка, Ю. Я. Кіт

Вступ. Неінвазивні методи досліджень клінічного стану організму людини широко застосовуються у медицині як діагностичні та прогностичні тести. Оскільки білковий склад сечі людини тісно асоційований із особливістю функціонування біологічних систем, його якісні та кількісні характеристики є перспективними маркерами контролю різноманітних процесів у організмі.

Мета. Дослідити спектр ізоформ кортактину в сечі хворих на цироз печінки (ЦП) та їх діагностичну цінність як потенційного молекулярного маркера його тяжкості.

Матеріали й методи. У рандомізований спосіб із попередньою стратифікацією за наявністю ЦП обстежено 12 хворих (жінки – 41,7 %, чоловіки – 58,3 %) віком $54,8 \pm 2,5$ року, які лікувалися у Львівському обласному гепатологічному центрі, створеному на базі кафедри внутрішньої медицини № 1 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та гастроентерологічного відділу Комерційного підприємства Львівської обласної ради «Львівська обласна клінічна лікарня». Із цих хворих на ЦП сформовано дослідну групу (ДГ), їм проведено комплексне клінічно-лабораторне та інструментальне обстеження всіх органів і систем відповідно до вимог сучасної медицини. Контрольну групу (КГ) сформовано з 10 практично здорових осіб відповідних статі й віку. У всіх обстежених хворих ДГ і практично здорових осіб КГ забрано по 10,0 мл ранкової порції сечі натще, яку готували відповідно до методики, а згодом осаджували білки зі застосуванням ацетону у співвідношенні 1:6 і піддавали SDS-електрофорезу з подальшим вестерн-блот аналізом із використанням комерційних моноспецифічних антикортактинових антитіл.

Статистичне опрацювання інформації проводили за допомогою програми Microsoft Office Excel 2010 із оцінкою достовірності виявлених змін із використанням парного критерію Стьюдента (В. С. Госсета) (різницю вважали вірогідною за $p < 0,05$). Діагностичну чутливість білка визначали за діагностичною специфічністю, прогностичною значимістю позитивних результатів, прогностичною значимістю негативних результатів, діагностичною ефективністю показника.

Результати. Білок 24,0 кДа, ідентифікований у 8 хворих на ЦП, фіксували лише в одному з 10 зразків сечі осіб КГ, поліпептид із молекулярною масою 64,0 кДа – у 9 хворих ДГ і 9 осіб КГ, білок із молекулярною масою 98,0 кДа не виявлено у сечі жодної особи з ДГ та лише однієї особи з КГ, білок із молекулярною масою 52,0 кДа – у 4 хворих ДГ і в жодній особі КГ.

Білок із молекулярною масою 52 кДа, виявлений у хворих ДГ, не фіксували в сечі жодної особи КГ. Аналіз інформації про чотирьох хворих, у сечі яких ідентифіковано білок із молекулярною масою 52,0 кДа, показав, що у всіх ЦП був у стадії декомпенсації, клас С за критеріями Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю, звідки можна припустити, що поява цього протеїну в сечі може бути асоційована з наростанням тяжкості ЦП. Діагностична чутливість показника – 33,3 %, діагностична специфічність – 100,0 %, прогностична значимість позитивних результатів – 100,0 %, прогностична значимість негативних результатів – 55,6 %, діагностична ефективність показника – 63,6 %.

Білок із молекулярною масою 24 кДа достовірно частіше був виявлений у ДГ (8 осіб), ніж у КГ (1 особа) ($p = 0,0039$). Серед 8 пацієнтів ДГ у 6 був ЦП у стадії декомпенсації, клас С за критеріями Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю, у двох – у стадії субкомпенсації, клас В за критеріями Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю.

Висновки. Дослідження вмісту білків у сечі за допомогою вестерн-блот аналізу з використанням комерційних антитіл до людського кортактину дало змогу ідентифікувати різні молекулярні форми пептидів, які відрізняються у хворих на цироз печінки різної етіології та у здорових людей. Лише в сечі хворих (клас С за критеріями Ч. Г. Чайлд – Р. Н. П'ю) дослідної групи ідентифікований білок із молекулярною масою 52,0 кДа, білок із молекулярною масою 24,0 кДа достовірно частіше був виявлений у дослідній групі, ніж у контрольній ($p = 0,0039$). Збільшення частоти виявлення протеїнів із молекулярною масою 24,0 кДа та поява протеїнів із молекулярною масою 52,0 кДа у сечі можуть бути асоційовані з виникненням декомпенсованої стадії цирозу печінки. Оцінка їх діагностичної цінності потребує подальших досліджень.

Ключові слова: кортактин, цироз печінки, вестерн-блот аналіз, електрофорез, діагностика.

Spectrum of Cortactin Isoforms in the Urine of Patients with Liver Cirrhosis and Their Diagnostic Value as a Potential Molecular Marker of its Severity

O. Fayura, M. Starikovych, O. Abrahamovych, M. Abrahamovych,
R. Stoyka, Yu. Kit

Introduction. Non-invasive methods of research of the human organism clinical conditions have been widely used in medicine as a diagnostic and prognostic test. Since the protein content of human urine is closely related to the peculiarity of the functioning of biological systems, its qualitative and quantitative characteristics are promising markers for control of various processes in organism.

An important source of protein markers is the results of detailed proteomics (two-dimensional electrophoresis of proteins followed by mass spectrometry) of human urine, depending on the disease. Recently, the protein of SRC8 (Sarc family protein kinase substrate or cortactin) was detected among 12 new proteins in urine protein analyzes in breast cancer patients.

The aim of the study. To investigate the spectrum of cortactin isoforms in the urine of patients with liver cirrhosis (LC) and their diagnostic value as a potential molecular marker of its severity.

Materials and methods. In a randomized pre-stratified method, 18 patients (women - 41.7 %, males - 58.3 %) of 54.8 ± 2.5 years old who were treated at Lviv Regional Hepatological Center based on the department of Internal Medicine №1 of Danylo Halytsky Lviv National Medical University and Gastroenterological Department of the Communal Nonprofit Enterprise of the Lviv Regional Council "Lviv Regional Clinical Hospital". The experimental group (EG) was formed of 12 patients (100.0 %) with LC of different etiology (6 people (50.0 %) - toxic-alimentary, 1 (8.3 %) - C-viral, 2 (16.7 %) - primary biliary, 2 (16.7 %) - toxic-alimentary + C-viral, 1 (8.3 %) - autoimmune + toxic-alimentary. The control group (CG) was formed of 10 practically healthy persons of the corresponding age and gender. Patients were provided with a comprehensive clinical-laboratory and instrumental examination of all organs and systems in accordance with the requirements of modern medicine. In addition, 10.0 ml of urine morning portion was taken in all of the examined persons, it was prepared according to the procedure, and subsequently the proteins with acetone were precipitated in a ratio of 1:6 and subjected to SDS-electrophoresis followed by Western blot analysis using commercial monospecific anti-cortactin antibodies.

Statistical processing of information was carried out using programs Microsoft Office Excel 2010 with the estimation of the authenticity of the revealed changes using the Student's t-criterion (W. S. Gossett) (the difference was considered significant for $p < 0.05$). Diagnostic sensitivity of the certain protein was determined by the diagnostic specificity, prognostic significance of positive results, prognostic significance of negative results, and diagnostic effectiveness of the parameter.

Results. During the study of the spectrum of immunologically reactive proteins in urine specimens of 12 patients with LC it was found that 9 of 12 patients had polypeptide with a molecular weight of 64 kDa, 4 subjects - 52 kDa protein, 8 - 24 kDa protein. It also has been found that immunoglobulin-related cortactin polypeptides with a molecular weight of 98, 64 and 24 kDa were present in the CG - 9 out of 10 urine specimens of healthy people containing protein with molecular weight of 64 kDa, one - 24 kDa, one - 98 kDa.

According to the comparative analysis of the results obtained, it can be argued that 24 kDa protein found in 8 patients with LC was observed only in one of 10 urine specimens of the controls; 64 kDa polypeptide - in 9 persons of EG and 9 controls; 98 kDa - in nobody from the EG and only in the urine of one patient of the CG; 52 kDa protein - in 4 persons of EG and in nobody from the controls.

52 kDa protein, found in individuals of the EG, was not detected in the urine of any patient from the CG. After analyzing the information on 4 patients in whose urine 52 kDa protein was identified, it was found that in all LC was at the stage of decompensation (class C according to the criteria of C. H. G. Child - R. N. Pugh), in connection with which it can be assumed that the appearance of this protein in urine may be associated with the LC severity increase. 24 kDa protein was significantly more commonly found in the EG (8 persons - 6 patients had LC at the stage of decompensation, class C according to the criteria of C. H. G. Child - R. N. Pugh, in two - at the stage of subcompensation, class B according to the criteria of C. G. Child - R. N. Pugh) than in the CG (1 person) ($p = 0.0039$).

Conclusions. Investigation of protein content in urine using western blot analysis using commercial antibodies to human cortactin allowed the identification of various molecular forms of peptides that differ in patients with liver cirrhosis of different etiology and healthy persons: the protein with the molecular weight of 52 kDa was present only in the urine of the experimental group patients, 24 kDa polypeptide was significantly ($p = 0.0039$) more likely common in the experimental than in the control group. The increase of the detection rate of 24.0 kDa proteins and the appearance of 52.0 kDa proteins in the urine may be associated with the appearance of the decompensated stage of liver cirrhosis. However, the assessment of their diagnostic value needs the further research.

Keywords: cortactin, liver cirrhosis, western-blot analysis, electrophoresis, diagnostics.