

Invenția se referă la medicină, în special la gastroenterologie, hepatologie și poate fi utilizată pentru determinarea funcției hepatice în hepatita cronică virală B și infecția cronică de HVB cu activitate minimă (forme ascunse și fără manifestări clinice caracteristice).

Este cunoscută metoda de diagnostic al dereglărilor funcționale hepatice prin evaluarea activității enzimelor serului sanguin, indicatorilor sindromului de citoliză, anume aminotransferazelor (alaninaminotransferaza (ALAT), aspartataminotransferaza (ASAT)) în cadrul patologiilor cronice hepatice [1].

Dezavantajul acestei metode constă în aprecierea dereglărilor hepatice funcționale în cadrul diferitor patologii cronice difuze ale ficatului conform evaluării indicilor sindromului de citoliză (aminotransferazelor ALAT și ASAT) odată în zi, a jeun, anume fără cercetarea cineticii enzimelor, această metodă pe larg se utilizează în cazuri manifestate clinic și paraclinic, cu activitate moderată sau maximă a proceselor hepatice când concentrația enzimelor în serul sanguin este suficient crescută și atrage atenția pacienților pentru adresarea la medicul specialist, cât și reacționarea medicilor specialiști la depistarea lor în staționar, fiind puțin informativă pentru aprecierea formelor latente ale hepatitelor cronice virale B cu activitate minimă, ceea ce este important în plan managerial, de investigație și medicamentos.

Cea mai apropiată după esență și rezultatul tehnic obținut este metoda de apreciere a parametrilor funcționali hepatici ai sindromului de citoliză, care prevede aprecierea aminotransferazelor ALAT, ASAT nu numai a jeun, dar și în dinamică, efectuarea testului de efort cu glucoză, care constă în administrarea a 50 g de glucoză, dizolvată în apă caldă cu aprecierea ulterioară a aminotransferazelor a jeun și la fiecare 30 min, în decursul de 2,5 ore după proba de efort cu glucoză [2].

Această probă de efort a fost utilizată în evaluarea pacienților cu diferite boli difuze ale ficatului (hepatită cronică persistentă, hepatită cronică activă, steatoză hepatică, ciroză hepatică).

Dezavantajul acestei metode de efort cu glucoză constă în utilizarea numai a unui activator al sistemelor intracelulare, și cercetarea parametrilor sindromului de citoliză (aminotransferazelor ALAT și ASAT) la anumite intervale de timp, 6 la număr, fără evidențierea formelor latente a hepatitelor cronice de etiologie HVB sau infecției cronice de HVB cu activitatea minimă a procesului hepatic și este incomod pentru pacienți cât din punctul de vedere a duratei testului (timp de 2,5 ore), cât și numărul probelor de sânge evaluate.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unei metode de determinare a funcției hepatice în hepatita cronică virală B și infecția cronică de HVB cu activitate minimă, cu utilizarea unei probe de efort dublu medicamentos cu glucoza și eufilina, cu stimularea mesagerilor intracelulari, care ar asigura aprecierea funcției hepatice, conform studierii parametrilor biochimici ai sindromului de citoliză cu aprecierea aminotransferazelor ALAT și ASAT cu posibilitatea ulterioară de stabilire a unui tratament eficient și monitoring al pacienților cu patologia menționată.

Esența invenției constă în aceea că se colectează sânge venos a jeun și se determină concentrația transaminazelor, și anume alaninaminotransferazei și aspartataminotransferazei, apoi se efectuează o probă de efort prin administrarea perorală a 50 g de glucoză, dizolvată în apă caldă și 0,5 g de eufilină, apoi se colectează sânge în dinamică peste 60 și 120 min, și repetat se determină concentrația transaminazelor, în cazul, în care în proba colectată peste 60 min de la proba de efort, concentrația alaninaminotransferazei se mărește de 1,3...1,8 ori, iar concentrația aspartataminotransferazei se mărește de 1,4...2,0 ori, iar în proba colectată peste 120 min de la proba de efort, concentrația alaninaminotransferazei se micșorează de 1,3...1,4 ori, iar concentrația aspartataminotransferazei se micșorează de 1,4...1,6 ori de la nivelul concentrației din probele colectate peste 60 min de la proba de efort, se determină dereglarea funcției hepatice.

Rezultatul tehnic al metodei propuse constă în utilizarea testului de efort dublu cu glucoză și eufilină, care elucidează mecanismele ascunse al anomaliilor funcționale hepatice, anume sindromului de citoliză ce permite diagnosticarea precoce și corectarea lor până la debutul clinico-paraclinic manifestat în special în hepatitele cronice de etiologie HVB sau infecție cronică de etiologie HVB cu activitate minimă, grație mecanismelor fine intracelulare activate.

Metoda constă în evaluarea parametrilor biochimici ai sindromului de citoliză (aminotransferazelor ALAT și ASAT), care reflectă starea ficatului nu numai a jeun, dar și după administrarea perorală a 50 g de glucoză și 0,5g de eufilină, peste 60 și 120 min de la începutul testului. La baza acestui test stă metoda de stimulare dublă a mesagerilor intracelulari, și anume administrarea simultană a eufilinei cu glucoză, ceea ce contribuie la: stimularea sistemului adenilatciclazei cu creșterea adenzin trifosfatului (ATF), pe de o parte, și la inhibarea fosfodiesterazei pe de altă parte, ceea ce are drept consecință acumularea în țesuturi de 3,5-adenozinmonofosfatului ciclic (AMFciclic), acesta fiind un mesager intracelular universal, care activează proteinkinaza cu producerea proteinelor și enzimelor specifice fosforilate cu acțiunea asupra hormonilor glucoreglatori.

Glucoza activează receptorul exterior pe suprafața membranei celulei, iar stimularea receptorului este transmisă spre transductor pe suprafața interioară a membranei, cu activarea ulterioară a adenilatciclazei. Aceasta la rândul său, stimulează conversia ATF (adenozin trifosfat) în 3', 5'-AMFc (adenozinmonofosfat ciclic), în rezultatul cărora sporesc procesele glicogenolizei în celulă, cu participarea microzomilor în acest proces, care este posibil doar sub activitatea celulară și respirația celulară normală. Un astfel de mecanism de stimulare a celulelor este comun nu numai la oricare dintre glande endocrine, dar și la orice celulă funcțională inclusiv și pentru hepatocit.

Glucoza activează adenilatciclaza, care sintetizează AMF ciclic (AMFc) din ATF. AMF ciclic la rândul său activează o anumită AMFc dependentă de proteinkinaza A, care fosforilează enzimele intracelulare, modificând astfel activitatea enzimei. Proteinkinaza este compusă din 4 subunități (tetrameri), dintre care două sunt reglatorii și

două - catalitice (în așa stare proteinkinază este inactivă). După legarea proteinkinazei a 4 molecule de AMFciclic urmează disocierea subunității catalitice care ulterior fosforilează proteine (enzime), cu schimbarea activității lor. AMF ciclic se distruge cu ajutorul fosfodiesterazei, transformate ulterior în AMF. Cu acest scop este utilizată eufilina, anume pentru blocarea fosfodiesterazei, ce duce la creșterea cantității de AMF ciclic cu producerea substanțelor proteice fosforilate active, care indică la prezența afecțiunilor ascunse la nivelul relațiilor celulare subtile. Enzima poate fosforila o anumită cantitate de serină și treonină la mai mult de 100 de proteine diferite, inclusiv și în mai multe enzime și factori de transcripție. Ca rezultat al fosforilării se schimbă activitatea funcțională a acestor proteine.

Astfel, în cadrul testului de efort dublu cu glucoză și eufilină sunt influențate două mecanisme menționate ale celulei, ce elucidează mecanismele ascunse ale anomaliilor metabolice intracelulare ce permite detectarea și corectarea lor până la debutul de manifestare clinic și paraclinic. Utilizarea probei de efort cu glucoză și eufilină permite depistarea timpurie a afecțiunilor hepatice la pacienții cu hepatită cronică virală HVB sau infecție cronică HVB în stare latentă, cu activitatea minimă cu simptome clinice și paraclinice ascunse.

Rezultatul tehnic al invenției propuse este cauzat de evaluarea parametrilor biochimici ai sindromului de citoliză (aminotransferazelor ALAT și ASAT), care reflectă starea ficatului nu numai a jeun, dar și după administrarea perorală a 50,0 g de glucoză și 0,5 g de eufilină peste 60 și 120 min de la începutul testului. Administrarea simultană a eufilinei și glucozei contribuie la:

- stimularea sistemului adenilatciclazei cu creșterea adenozintrifosfatului (ATF), pe de o parte, și
- la inhibarea fosfodiesterazei pe de altă parte, ceea ce are drept consecință acumularea în țesuturi de 3,5-adenozinmonofosfat ciclic (AMFciclic), acesta fiind un mesager intracelular universal, care activează proteinkinaza cu producerea proteinelor și enzimelor specifice fosforilate cu acțiune asupra hormonilor glucoreglatori.

Sindromul de citoliză, reprezintă un complex din indici de laborator, care apar în cadrul distrugerii celulelor hepatice după acțiunea diferitor factori agresivi, inclusiv și cei virali și se caracterizează în primul rând prin dereglarea permeabilității membranelor celulare cu devierea conținutului citoplasmei și a organelor în serul sangvin.

Celula în stare de citoliză poate supraviețui, dar cu scăderea rezervelor funcționale ce se reflectă la starea funcțională a ficatului. Sindromul de citoliză reprezintă un marker important al unui proces patologic în ficat. Actualmente enzimele, îndeosebi ALAT și ASAT, apreciate în serul sangvin o dată în zi indică starea funcțională a ficatului.

Estimarea indicilor de bază ai sindromului de citoliză (alaninaminotransferazei (ALAT) și aspartataminotransferazei (ASAT)), se efectuează preponderent în cazul activității moderate sau maxime a unui proces parenchimos hepatic. Totodată, prezența infecției cu virusul hepatitei B de lungă durată, cu evoluție lentă, mascat de indicii normali a sindromului de citoliză, duce la procese distructive, ce provoacă formarea fibrozei hepatice cu dezvoltarea cirozei hepatice diagnosticate în stadiile finale.

Reieșind din cele expuse, este importantă depistarea precoce a dereglărilor stării funcționale a ficatului la pacienții cu hepatite cronice virale HVB și infecție cronică de etiologie HVB atât pentru managementul adecvat, monitoringul pacienților la timp, cât și pentru corecția medicamentoasă adecvată, care este direcționată spre recuperarea funcției hepatice.

Metoda se efectuează în modul următor.

De la pacient, în starea de liniște emoțională și fizică i se colectează sânge venos pe nemâncate (a jeun) și se determină concentrația bazală a transaminazelor, și anume alaninaminotransferazei și aspartataminotransferazei, apoi se efectuează o probă de efort prin administrarea perorală a 50g de glucoză, dizolvată în apă caldă și 0,5 g de eufilină, apoi se colectează sânge în dinamică peste 60 și 120 min, și se determină concentrația transaminazelor, în cazul, în care în proba colectată peste 60 min de la proba de efort, concentrația alaninaminotransferazei se mărește de 1,3...1,8 ori, iar concentrația aspartataminotransferazei se mărește de 1,4...2,0 ori, iar în proba colectată peste 120 min de la proba de efort, concentrația alaninaminotransferazei se micșorează de 1,3...1,4 ori, iar concentrația aspartataminotransferazei se micșorează de 1,4...1,6 ori de la nivelul concentrației din probele colectate peste 60 min de la proba de efort, se determină dereglarea funcției hepatice.

Evaluarea concentrației alaninaminotransferazei, aspartataminotransferazei s-a efectuat cu seturi standard „Haman” (Germania), în conformitate cu cerințele IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), cu analiza datelor obținute.

În studiul efectuat persoanele au fost reparizate în 3 loturi :

- lotul 1 - grupa martor, au fost cercetate un grup de 62 de persoane practic sănătoase;
- lotul 2 - a fost constituită din 56 de pacienți cu hepatită cronică virală HVB, forma HBeAg- și anti-HBe+ cu activitate minimă a procesului hepatic;
- lotul 3, - a fost constituită din 28 de pacienți cu infecție cronică virală B, forma HBsAg-negativă, în lipsa ADN HBV în ser, dar în prezența anti-HBcor+ și/sau anti-HBs+, care nu au fost vaccinați anterior – forma HBsAg-.

Exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

În calitate de lotul martor (LM) pentru aprecierea indicilor normali ai funcției hepatice în decursul probei de efort cu glucoză și eufilină au fost cercetați 62 de persoane practic sănătoase, la care a fost efectuată aceeași probă de efort cu administrarea *per os* 50 g de glucoză, dizolvată în apă caldă și 0,5 g de eufilină, timp de 5 min, cu evaluarea transaminazelor (ALAT și ASAT) în aceleași intervale de timp (bazal, peste 60 și 120 de min).

În exemplul dat au fost examinate lotul 1 martor și lotul 2, care au constituit 56 de pacienți cu hepatita cronică virală HBV forma HBeAg- și anti-HBe+ cu activitatea minimă a procesului hepatic.

La ora 8.00 pacienților li s-a colectat sânge a jeun pentru testarea ALAT și ASAT bazală, ulterior s-a administrat *per os* 50 g de glucoză, dizolvată în apă caldă și 0,5 g de eufilină, timp de 5 min. Peste 60 și 120 min după administrarea preparatelor s-a efectuat colectarea sângelui în dinamică pentru evaluarea parametrilor biochimici menționați mai sus.

Cercetarea sindromului de citoliză s-a efectuat după curbele cineticii enzimelor alaninaminotransferazei și aspartataminotransferazei.

Pentru aprecierea caracterului normal a enzimogramelor, cinetica ALAT și ASAT a fost cercetată în lotul persoanelor practic sănătoși (62 de persoane), care a servit ulterior proba martor și utilizată în calitate de control.

Cinetica transaminazelor la persoanele sănătoase se caracterizează prin creșterea valorilor după 60 min după stimulare pentru ALAT de 1,79 ori și pentru ASAT de 1,93 ori (ALAT –  $44,66 \pm 1,74$  u/l,  $p < 0,01$ ; ASAT –  $31,90 \pm 2,2$  u/l,  $p < 0,01$ ), iar după 120 min cu revenirea ulterioară a activității enzimelor până la valorile inițiale (ALAT -  $24,36$  u/l și ASAT -  $17,6$  u/l).

La bolnavii cu hepatită cronică HVB forma HBeAg- cu activitate minimă a procesului hepatic s-a determinat o creștere a activității a ALAT ( $33,80 \pm 2,58$  u/l (bazală);  $56,47 \pm 3,57$  u/l  $p < 0,01$ ; (după 60 min);  $41,36 \pm 3,52$  u/l,  $p < 0,01$  (după 120 min), după efectuarea probei de efort comparative, după 60 min, concentrația alaninaminotransferazei s-a mărit de 1,77 ori, comparativ cu parametrii similari la persoanele din lotul-martor, iar după 120 min de la debutul probei de efort concentrația alaninaminotransferazei s-a micșorat de 1,36 ori comparativ cu concentrația enzimei după 60 min de la efectuarea testului de efort.

Activitatea ASAT ( $21,20 \pm 1,84$  u/l (bazală),  $43,0 \pm 2,26$  u/l,  $p < 0,01$  (după 60 min) și  $26,42 \pm 2,34$  u/l,  $p < 0,01$  (după 120 min)), după 60 min de la proba de efort se caracterizează prin mărirea concentrației aspartataminotransferazei de 2,02 ori, comparativ cu parametrii similari la persoanele din lotul-martor, iar după 120 min de la debutul probei de efort concentrația aspartataminotransferazei s-a micșorat de 1,6 ori, comparativ cu concentrația enzimei după 60 min de la efectuarea testului de efort.

În hepatita cronică HVB forma HBeAg- cu activitatea minimă, activitatea ALAT și ASAT (60 și 120 min) a fost mai crescută în diferite intervale a testului de efort în raport cu parametrii similari la persoanele sănătoase. La bolnavii cu HCVB forma HBeAg- cu activitatea minimă curbele transaminazelor (ALAT, ASAT) sunt plasate la valori mai crescute.

Datele obținute au permis schimbarea protocolului de management al acestui grup de pacienți, includerea lor în plan de monitorizare cu dispanserizare de 2 ori/an, cu efectuarea în dinamică a testului de efort cu utilizarea glucozei și eufilinei, având în vedere posibilitatea de activizare a procesului hepatic. Pacienților li s-au recomandat efectuarea investigațiilor pentru aprecierea gradului de fibroză (APRI, Fibroscan), având în vedere că forma HBeAg negativă se consideră tradițional ca formă latentă și deseori este non-estimată. Totodată, evaluarea cineticii enzimelor sindromului de citoliză a permis administrarea preparatelor hepatoprotectoare cu efect membranostabilizator (AUDC).

### Exemplul 2

În calitate de lotul martor (LM) pentru aprecierea indicilor normali ai funcției hepatice în decursul probei de efort cu glucoză și eufilină au fost cercetați 62 de persoane practic sănătoase, la care a fost efectuată aceeași probă de efort cu administrarea *per os* 50 g de glucoză, dizolvată în apă caldă și 0,5 g de eufilină, timp de 5 min, cu evaluarea transaminazelor (ALAT și ASAT) în aceleași intervale de timp (bazal, peste 60 și 120 de min).

În exemplul dat au fost examinate lotul 1 martor și lotul 3, care au constituit 28 de pacienți cu infecție cronică virală B, forma HBsAg-negativă, în lipsa ADN HBV în ser, dar în prezența anti-HBcor+ și/sau anti-HBs+, care nu au fost vaccinați anterior – forma HBsAg-. Pacienții cu infecție cronică de etiologie HVB forma HBsAg-, "forma ocultă" este cea mai dificilă formă pentru diagnosticarea funcției hepatice fără efectuarea puncției hepatice.

La ora 8.00 pacienților li s-a colectat sânge a jeun pentru testarea ALAT și ASAT bazală, ulterior s-a administrat *per os* 50 g de glucoză, dizolvată în apă caldă și 0,5 g de eufilină, timp de 5 min. Peste 60 și 120 min după administrarea preparatelor s-a efectuat colectarea sângelui în dinamică pentru evaluarea parametrilor biochimici menționați mai sus.

Cercetarea sindromului de citoliză s-a efectuat după curbele cineticii enzimelor alaninaminotransferazei și aspartataminotransferazei.

Pentru aprecierea caracterului normal al enzimogramelor, cinetica ALAT și ASAT a fost cercetată în lotul persoanelor practic sănătoși (62 de persoane), care a servit proba martor și utilizată în calitate de control.

Cinetica transaminazelor la persoanele sănătoase se caracterizează prin creșterea valorilor de 1,79 ori pentru ALAT și 1,93 ori pentru ASAT, după 60 min de la stimulare (ALAT –  $44,66 \pm 1,74$  u/l,  $p < 0,01$ ; ASAT –  $31,90 \pm 2,2$  u/l,  $p < 0,01$ ), cu revenirea ulterioară a activității enzimelor până la valorile inițiale către finele probei, după 120 min de la stimulare (ALAT -  $24,36$  u/l și ASAT -  $17,6$  u/l).

În infecția cronică virală de etiologie HVB forma HBsAg negativă a fost studiată activitatea transaminazelor (ALAT, ASAT) a jeun și în dinamică, după efectuarea probei de stimulare cu glucoză și eufilină (la 60 și 120 min). Activitatea bazală (a jeun) a ALAT ( $27,04 \pm 1,71$  u/l) și ASAT ( $15,36 \pm 1,38$  u/l) determinate în acest lot de pacienți nu s-a deosebit semnificativ de valorile transaminazelor în lotul martor, dar au avut o tendința de creștere. Aspectul curbelor enzimogramelor ALAT și ASAT în infecția cronică HBV forma HBsAg - este similar celui apreciat în lotul

martor. Însă, în grupul interpretat ascensiunea valorilor transaminazelor ca răspuns la stimulare cu glucoză și eufilină după 60 min, testul nu a fost atât de evident – ALAT a crescut de 1,35 ori (36,4 u/l), iar ASAT – de 1,47 ori (22,63 u/l), iar după 120 min de la debutul probei de efort ALAT s-a micșorat de 1,3 ori, iar ASAT de 1,4 ori, comparativ cu concentrația enzimei după 60 min de la efectuarea testului de efort.

La pacienții cu infecție cronică HBV forma HBsAg negativă a fost determinată dereglarea enzimogramelor ALAT, ASAT în dinamică, după efectuarea testului de efort cu glucoză și eufilină comparativ cu lotul martor. Acest aspect neobișnuit de reacție la testul de efort posibil poate fi explicat prin reacția organismului infectat cu virusul HVB timp îndelungat cu cronicizarea stresului hormonal metabolic și oxidativ. Formele HBsAg negativă și anti HBe+ cu activitate minimă sunt puțin studiate, în cadrul cărora se efectuează integrarea virusului în genomul hepatocitar cu persistența ulterioară permanentă, se dezvoltă epuizarea mecanismului de apărare la nivelul ficatului și a organismului integral, poate fi referit la stadiul 3 de dezvoltare a stresului, conform savantului H. Selye. Mecanismele stresului viral-oxidativ și a progresării hepatitelor cronice, îndeosebi formele latente se produc cu participarea hormonilor fazei lente a stresului (ACTH, cortizol, STH, prolactină) cât și a hormonilor tiroidieni. În hepatitele cronice virale de etiologie HVB, HVC, persistența stresului oxidativ este asociată și cu apariția insulinoresistenței, care accelerează fibrogeneza.

Aplicând metoda propusă, au fost examinați pacienți cu diferite forme de patologie cronică HBV în dependență de activitatea procesului hepatic, au fost depistate deviații a sindromului citolitic în grupul pacienților fără sindrom citolitic prezent, ceea ce a permis efectuarea diagnosticului diferențial al funcției hepatice, optimizarea managementului pacienților în mod individual, perfectarea investigațiilor suplimentare a pacienților conform schimbărilor apreciate, cât și adaptarea tratamentului corespunzător.

Datele obținute au permis schimbarea protocolului de management al acestui grup de pacienți, cu recomandări de efectuare a investigațiilor suplimentare a hormonilor fazei lente a stresului (adrenocorticotropina, cortizol, somatotropina, prolactina), hormonilor tiroidieni (T3, T4, TTG), aprecierea gradului de fibroză (APRI, Fibroscan), având în vedere că forma HBsAg negativă se consideră tradițional ca formă latentă și deseori este non-estimată. Totodată, evaluarea cineticii enzimelor sindromului de citoliză a permis administrarea preparatelor cu acțiunea antioxidantă și hepatoprotectoare (AUDC, vitamine).