

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОКСИДА АЗОТА И ЭНДОТОКСИНА ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

Нилова Т. В., Звенигородская Л. А., Черкашова Е. А.

Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии, Москва

Нилова Тамара Васильевна

111123, Москва, шоссе Энтузиастов, д. 86

Тел.: 8 (495) 304 3027

РЕЗЮМЕ

Целью исследования было изучение роли оксида азота (NO) в формировании воспаления у больных с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП). Обследовано 90 больных (65 женщин, 25 мужчин), из которых у 30 больных диагностирован стеатоз печени и у 60 — неалкогольный стеатогепатит. Индекс массы тела у всех больных увеличен в среднем на 35–40%. Уровень метаболитов NO в сыворотке крови определяли по методу В. А. Метельской (2008). Получено достоверное увеличение содержания метаболитов NO у больных НАЖБП по сравнению со стеатозом печени и контролем, что коррелировало с повышением активности печеночных ферментов. NO как маркер воспаления может служить критерием оценки воспалительного процесса в печени на ранней стадии перехода от стеатоза печени к стеатогепатиту.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени; стеатоз печени; неалкогольный стеатогепатит; воспаление, оксид азота.

SUMMARY

The aim of this examination was investigation of the nitrogen oxide (NO) role for the inflammation forming in the patients with nonalcoholic fat disease of the liver. 90 patients (male — 25, women — 65) were examined: steatohepatitis (SH) — 60 patients, liver steatosis — 30 patients). Index of body mass was increased on 40–45%. NO metabolites blood level was examined by Metelskaya V. A. (2005) method. The trustworthy increase of NO production in the SH patients in comparison in patients with steatosis liver and was increasing together with aminotransferases and GGTP. NO as inflammation marker may be real criterion of the liver inflammation in the patients with the early stage transformation of liver steatosis to SH.

Keywords: liver steatosis; nonalcoholic steatohepatitis; inflammation; NO metabolites level.

ВВЕДЕНИЕ

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) в большинстве случаев представляет собой следствие метаболического синдрома, критериями которого являются абдоминальное ожирение, артериальная гипертензия, атерогенная дислипидемия, нарушение толерантности к глюкозе или сахарный диабет 2-го типа, гиперурикемия и т. д. На первой стадии заболевание протекает как жировой гепатоз (стеатоз) печени, во второй стадии на фоне жировой дистрофии гепатоцитов с наличием воспалительной инфильтрации формируется неалкогольный стеатогепатит (НАЖБП) [1; 2]. В последние годы рассматривают ведущую роль хронического воспалительного процесса

в развитии метаболического синдрома и инсулинорезистентности (ИР) [3].

Одним из ранних провоспалительных медиаторов, запускающих целый ряд патологических процессов, в том числе и воспалительной реакции организма, является оксид азота (NO), который считается маркером воспаления. Воздействие бактериальных липополисахаридов и цитокинов индуцирует синтез оксида азота различными клетками (макрофагами, нейтрофилами, гепатоцитами, эндотелиальными клетками). NO легко проникает через биологические мембраны и взаимодействует с железосодержащими ферментами и белками, тем самым изменяя активность ферментов.

Взаимодействие NO с белками, содержащими сульфгидрильные группы, приводит к нитрозированию белков с образованием нитрозотиолов. С активными формами кислорода NO образует пероксинитриты, которые могут вызывать модификацию белков переносчиков липидов, нуклеиновых кислот, участвующих в липидном метаболизме [4–6]. Клинические, лабораторные и инструментальные методы диагностики НАСГ не являются специфичными. Диагностика НАСГ с помощью УЗИ малоинформативна и сводится к стандартному заключению: признаки хронического диффузного поражения печени. Особая роль отводится пункционной биопсии печени и морфологическому подтверждению диагноза [7]. Клинические признаки и биохимические показатели, как правило, соответствуют морфологическим изменениям в печени.

Целью настоящего исследования явилось изучение уровня NO (суммарной концентрации нитратов и нитритов) в сыворотке крови при НАЖБП у больных в стадии стеатогепатита как раннего маркера воспаления, прогнозирования течения заболевания и для коррекции фармакотерапии. В последнее время широко обсуждается роль избыточного бактериального роста в патогенезе неалкогольного стеатогепатита. В исследование входило определение эндотоксина в сыворотке крови и его влияние на нитроксидсинтазную активность по уровню оксида азота у больных НАСГ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 90 больных НАЖБП, характеристика которых представлена в *табл. 1*.

В 1-ю группу вошли 30 больных со стеатозом печени с ИМТ 33,2. Больные НАСГ составили 2-ю группу с ИМТ 34,85. Из 90 больных 65 человек составили женщины. Верификацию диагноза проводили по данным клинических, биохимических, инструментальных методов исследования, включая пункционную биопсию печени. У больных с НАСГ наблюдалась общая слабость, повышенная утомляемость, боли в правом подреберье, диспепсические явления. Гепатомегалия наблюдалась у 50% больных. При анализе биохимических показателей крови в первой группе при стеатозе печени изменений не наблюдалось, а во второй группе НАСГ отмечено достоверное повышение в плазме крови аланиновой аминотрансферазы (АЛТ) и аспарагиновой трансферазы (АСТ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), повышение общего холестерина (ХС), ХС липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов (ТГ) и снижение ХС липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) (*табл. 2*).

При проведении УЗИ выявлялся жировой гепатоз или хроническое диффузное поражение печени. Пункционная биопсия печени для морфологического анализа была проведена 30 больным.

Основные морфологические изменения обследованных больных характеризовались крупнокапельной жировой дистрофией гепатоцитов. Воспалительная реакция представлена преимущественно внутридольковыми инфильтратами, состоящими из полиморфноядерных лейкоцитов, лимфоцитов и мононуклеарных фагоцитов. Могут также встречаться жировые кисты и липогранулемы. Уровень метаболитов NO в сыворотке крови определяли экспресс-методом, разработанным в НИИ профилактической медицины под руководством проф. Н. В. Перовой. Метод зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития ФС № 2008/229 код 2302. 2008 г. а /а 0001634.

Сущность метода заключается в одновременном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии хлористого ванадия (Германия) и реакции диазотирования нитритом сульфаниламида. Уровень метаболитов определяли колориметрическим методом по развитию окраски с реактивом Грисса. Определение метаболитов NO оправдано в том случае, если исключены все источники нитратов. Основными источниками нитратов в пище человека являются мясо, рыба, овощи, особенно стебли растений, корнеплоды, пиво, вино, квас. Время полувыведения из организма поступивших с пищей нитратов составляет 6 часов. Кровь для анализа берется натощак после низконитратного ужина. Содержание суммарных метаболитов NO в сыворотке крови добровольцев колебалось от 37,2 до 87,2 мкмоль/л. В контрольной группе из здоровых людей содержание оксида азота составляет $32,5 \pm 0,51$ мкмоль/л [8]. Важную роль придают эндотоксинемии в патогенезе разнообразной патологии, а также в патогенезе НАСГ [9]. Активность эндотоксина в сыворотке крови определяли набором реактивов (США). Использовали ЛАЛ-тест для определения активности эндотоксина хромогенным методом по конечной точке у больных НАСГ. Для статистической обработки данных использовали программы *MS Excel* и *Biostat*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание стабильных метаболитов NO в сыворотке крови больных НАЖБП представлено в *табл. 1*.

Сравнительный анализ содержания NO показал, что воспалительный процесс при НАСГ достоверно сопровождался повышенной продукцией оксида азота. Согласно полученным данным, у больных НАСГ обнаружено достоверное повышение NO и составляло $207,64 \pm 15,06$ мкмоль/л ($p < 0,001$). NO увеличился в 6,4 раза



Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И СОДЕРЖАНИЕ ОКСИДА АЗОТА ПРИ НАЖБП							
Диагноз	Кол-во	Муж.	Жен.	Возраст	имт	Уровень оксида азота, мкмоль/л	p
1-я группа, стеатоз печени	30	7	23	53,14 ± 3,4	33,2 ± 1,2	64,21 ± 4,26	0,001
2-я группа, АСГ	60	18	42	55,64 ± 2,2	34,85 ± 1,7	207,64 ± 15,06	0,001
Всего больных	90	25	65				
Контроль	20					32,15 ± 0,51	

Примечание: p — сравнение группы с контролем; p* — сравнение 1-й и 2-й групп.

Таблица 2

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ БОЛЬНЫХ НАСГ		
Показатель	Норма	Значение
АЛТ (е/л)	5,0 – 45	137,5 ± 22,4*
АСТ (е/л)	5,0 – 35	107,82 ± 18,6*
ГГТП (е/л)	7,0 – 24	109,1 ± 16,5*
ЩФ (е/л)	100 – 290	184,4 ± 14,3*
Билирубин (мкмоль/л)	5,019	12,4 ± 4,3
Общ. ХС (ммоль/л)	1,4 – 5,2	7,2 ± 2,34*
ХС ЛПНП (ммоль/л)	2,3 – 4	4,86 ± 1,4
ХС ЛПВП (ммоль/л)	1,19 – 2,0	0,7 ± 0,1
ТГ (мкмоль/л)	0 – 1,7	4,46 ± 2,1*

Примечание: *p < 0,05.

по отношению к контролю. Выявлено достоверное повышение уровня NO у больных НАСГ по сравнению с больными стеатозом печени и контролем. Уровень метаболитов NO возрастал параллельно активности ферментов АЛТ, АСТ, ГГТП. Уровень оксида азота и активность АЛТ находятся в прямой корреляционной связи: $r = 0,864$, $t = 4,862$, $p < 0,001$. Данная взаимосвязь свидетельствует о зависимости NO от воспалительного процесса в печени и степени сохранности функции гепатоцитов, что подтверждается морфологическими исследованиями биоптатов печени. Морфологическая картина ткани печени при стеатозе представлена жировой крупнокапельной диффузной инфильтрацией (рис. 1 см. на цветной вклейке). При воспалительной реакции обнаружены преимущественно внутридольковые инфильтраты, состоящие из полиморфноядерных лейкоцитов, лимфоцитов и мононуклеарных фагоцитов. При стеатогепатите вокруг очагов стеатонекроза формируются воспалительные гранулемы (рис. 2, 3 см. на цветной вклейке) и стеатогепатит с высокой степенью жировой инфильтрации (рис. 4 см. на цветной вклейке).

Существенную роль в прогрессировании НАСГ принадлежит эндотоксинам и цитокинам. Эндотоксины, поступающие в системный и портальный кровоток, оказывают токсическое действие на эндотелий сосудов и синусоидов печени. Эндотоксин представляет собой липополисахаридный комплекс клеточной стенки большинства грамотрицательных бактерий. Проникновение токсинов и микроорганизмов в кровоток и в просвет брюшной полости происходит вследствие нарушения барьерной функции кишки, нарушения микроциркуляции и непосредственного воздействия токсических веществ на слизистую оболочку кишечника. Избыточный бактериальный рост в кишке является причиной повреждения мембранных ферментов микробными токсинами и нарушением мембранного пищеварения. Бактериальные ЛПС являются стимулятором продукции макрофагами оксида азота. Эндотоксины и цитокины индуцируют клеточное повреждение гепатоцитов и синтез NO, что подавляет клеточное дыхание митохондрий, а оксид азота не вовлекается в повреждение гепатоцитов, индуцированное ЛПС и цитокинами [10]. В нашем исследовании использовали ЛАЛ-тест для определения эндотоксина хромогенным методом по конечной точке. У больных НАСГ активность эндотоксина была увеличена в 7 раз — $2,2 \pm 0,04$ ЕЭ/мл у 34 больных. В результате проведенного комплексного лечения с включением бифидоформа активность эндотоксина снизилась у 22 больных до $0,9 \pm 0,01$ ЕЭ/мл (норма $0,29 \pm 0,05$ ЕЭ/мл), $t = 6,508$, $p = 0,001$. Увеличение продукции сывороточного эндотоксина сопровождалось ростом синтеза оксида азота в 6,5 раза до лечения и в результате фармакотерапии, отмечалось снижение активности эндотоксина и содержания оксида азота до $124,1 \pm 6,24$ мкмоль/л, $t = 5,08$, $p = 0,001$. При сравнении содержания эндотоксина и оксида азота до и после лечения коэффициент корреляции двух линий регрессии равен $0,575$, $t = 3,297$, $p = 0,003$.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наиболее существенным фактором патогенеза НАЖБП, ведущим к накоплению жира в печени, является инсулинорезистентность (ИР). По данным последних исследований, ИР коррелирует со статусом хронического слабовыраженного воспаления [11]. Биохимической основой МС является повышение в крови свободных жирных кислот (СЖК), происходит их накопление и увеличение в печени. Различные медиаторы — СЖК, фактор некроза опухолей (ФНО-α), резистин, адипонектин, лептин, синтаза NO и другие — регулируют чувствительность рецепторов к инсулину [12]. Обнаружена связь массы жира в организме и его расположением в абдоминальной области с маркерами хронического воспаления [13]. Индекс массы тела у больных НАЖБП превышал показатели нормы и был увеличен у всех больных на 35%. При гипергликемии и ожирении не только гепатоциты, но и адипоциты секретируют белки острой фазы воспаления. Различные медиаторы воспаления, в том числе и индуцибельная синтаза оксида азота, секретируются из жировой ткани и регулируют чувствительность рецепторов к инсулину. При неалкогольной жировой болезни печени у больных НАСГ отмечается достоверное повышение оксида азота в сыворотке крови по отношению к группе больных со стеатозом печени и контролем в 3,2 и 6,4 раза соответственно, что отражает развитие воспалительного процесса. Активация синтазы оксида азота приводит к повышению оксида азота, который может как уничтожать бактерии, блокировать апоптоз и ограничивать воспаление, так и индуцировать апоптоз. Регуляторную роль NO в апоптозе нейтрофилов изучали у доноров. Увеличение метаболитов NO препятствует развитию клеточной гибели нейтрофильных лейкоцитов [14]. При воспалительной реакции повышение содержания оксида азота обеспечивает защитный эффект. При различных воспалительных заболеваниях печени, по данным литературы, повышаются уровень оксида азота, активность перекисного окисления липидов и отмечается активность печеночных ферментов [15]. При анализе биохимических показателей в группе НАСГ отмечено достоверное повышение активности аминотрансфераз. ГГТП была повышена в 3–5 раз. АЛТ и АСТ — в 3 раза (табл. 2).

Накопление СЖК в гепатоцитах может приводить к набуханию митохондрий, усилению мембранной проницаемости, что может стать причиной

повышения активности аминотрансфераз [16]. Характерной чертой воспаления является накопление нейтральных липидов, главным образом триглицеридов, в цитозоле печеночных клеток. У больных НАСГ содержание ТГ увеличено в 3–4 раза. Уровень оксида азота и АЛТ находятся в прямой корреляционной зависимости, что связано с развитием воспаления и деструкции гепатоцитов. Формирование НАСГ сопровождается воспалительно-некротическими изменениями в печени. Морфологическая картина печени подтверждает наличие воспаления.

Оксид азота является одним из факторов антимикробной защиты организма. Он уничтожает множество типов патогенных микроорганизмов (вирусы, бактерии, грибы, простейшие). Внутриклеточные эффекты оксида азота зависят от его взаимодействия с супероксидным радикалом, металлсодержащими белками, сульфгидрильными группами белков. Оксид азота можно рассматривать как ранний маркер активности воспалительного процесса в печеночной клетке. Установленная корреляция позволяет предположить, что одним из механизмов, запускающих воспалительную реакцию, является оксид азота, его повышенное содержание проявляет защитное действие на гепатоциты.

ВЫВОДЫ

1. У больных неалкогольной жировой болезнью печени при НАСГ в отличие от стеатоза отмечается достоверное повышение оксида азота в сыворотке крови в 6–7 раз по сравнению с контролем, что отражает развитие воспалительного процесса и сопровождается повышением активности ферментов АЛТ, АСТ, ГГТП. Уровень NO и АЛТ находятся в прямой корреляционной связи, что зависит от воспалительного процесса в печени.

2. Определение оксида азота как раннего маркера воспалительной реакции может служить дополнительным критерием оценки течения неалкогольной жировой болезни печени, контролем эффективности проводимой фармакотерапии и прогноза заболевания.

3. У больных НАСГ активность бактериального эндотоксина увеличена в 7 раз, что индуцировало нитроксидсинтазную активность и увеличение уровня оксида азота в сыворотке крови.



ЛИТЕРАТУРА

1. Лазебник Л. Б., Звенигородская Л. А. Метаболический синдром и органы пищеварения. — М.: Анахарсис, 2009. — 184 с.
2. Бугверов А. О., Богомолов П. О., Маевская М. В. Патогенетическое лечение неалкогольного стеатогепатита обоснование, эффективность, безопасность // Тер. арх. — 2007. — № 8. — С. 1–4.
3. Tilg H., Moschen A. R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance // Mol. Med. — 2008. — Vol. 14, № 3–4. — P. 222–231.
4. Shinde U. A., Mehta F. A., Goyal R. K. Nitric oxide: A molecule of the millennium // Indian J. Exper. Biology. — 2000. — Vol. 38. — P. 201–210.
5. Манухина Е. Б., Дауни Х. Ф., Маллет Р. Т. и др. Защитные и повреждающие эффекты периодической гипоксии. Роль оксида азота // Вестн. РАМН. — 2007, № 2. — С. 25–33.
6. Ковальчук Л. В., Хараева З. Ф. Роль оксида азота в иммунопатогенезе стафилококковых инфекций // Иммунология. — 2003. — № 3. — С. 186–188.
7. Подымова С. Д. Жировой гепатоз, неалкогольный стеатогепатит. Клинико-морфологические особенности. Прогноз. Лечение // МРЖ. Болезни органов пищеварения. — 2005. — Т. 7, № 2. — С. 61–67.
8. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // Клин. лабор. диагн. — 2005. — № 6. — С. 15–18.
9. Wigg A. Y. The role of small intestinal bacterial overgrowth in intestinal permeability, endotoxaemia and tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis // Gut. — 2001. — Vol. 48. — P. 206–211.
10. Liang J. F., Akaike T., Kim S. C. Nitric oxide is not involved in lipopolysaccharide and cytokine mixture-induced cellular injuries in primary cultured hepatocytes // Biochem. Biophys Res Commun. 1997. — Vol. 240, № 3. — P. 664–668.
11. Шварц В. Воспаление как фактор патогенеза инсулинорезистентности и сахарного диабета 2-го типа // Тер. арх. — 2009. — № 10. — С. 74–80.
12. Корнеева О. Н., Дробкина О. М., Бугверов А. О. и др. Неалкогольная жировая болезнь печени как проявление метаболического синдрома // Клин. перспективы гастроэнтерол., гепатол. — 2005. — № 4. — С. 21–24.
13. Festa Adostino R., Williams K., Karter A. I. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation // Int. J. Obesity. — 2001. — Vol. 25, № 10. — P. 1407–1415.
14. Степовая Е. А., Жаворонок Т. В., Старииков Ю. В. и др. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2008. — Т. 146. — С. 646–650.
15. Петухов В. И., Баумане Л. Х., Калвиныш И. Я. и др. Хронический гепатит С: количественный ЭПР-анализ содержания оксида азота и меди в крови пациентов // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2008. — Т. 146, № 12. — С. 704–706.
16. Яковенко Э. П. Метаболические заболевания печени // Фарма-тека. — 2003. — № 10. — С. 31–39.