

Петухов В.И. *, Шкестерс А.П., Розентале Б.**, Иванченко Л.А.**, Баумане Л., Калвиныш И.***, Силова А.А., Лармане Л., Мустафин П.В.

Рижский университет Страдыня, *Высшая школа психологии, **Латвийский центр инфектологии,

***Латвийский институт органического синтеза, Рига

ХРОНИЧЕСКИЙ С-ГЕПАТИТ: ПРОДУКЦИЯ ОКСИДА АЗОТА (NO) И РЕДОКС-СТАТУС У ПАЦИЕНТОВ, ПРОЖИВАЮЩИХ В СЕЛЕНДЕФИЦИТНОМ РЕГИОНЕ

Согласно полученным данным, у больных, с впервые выявленным хроническим вирусным гепатитом и сравнительно низкой обеспеченностью селеном, уже в дебюте болезни, который сопровождается высокой активностью плазменной АЛТ, обнаружено достоверное увеличение NO-продукции, а также показателей БЛХП и МДА плазмы. Наряду с этим у всех пациентов была снижена эритроцитарной $Cu / Zn - 30D$, что может свидетельствовать об ослаблении внутриклеточной антиоксидантной защиты.

Страны Балтии (в том числе Латвию), из-за низкого содержания селена (Se) в почве, относят к Se-дефицитным регионам Восточной Европы. Проведенные нами исследования по обеспеченности селеном беременных жительниц Риги и практически здоровых рижан обоего пола (заметим, что в Риге живет около половины всего населения Латвии) свидетельствуют о выраженном недостатке этого элемента у абсолютного большинства рижских жителей: распространенность Se-дефицита среди беременных была $\approx 100\%$ и более 65% – в общей группе рижан из обеспеченных слоев населения [1].

Известно также, что низкий селеновый статус способствует распространению и большей агрессивности некоторых РНК-содержащих вирусов. Так, амиокардитный штамм вируса Коксаки B_3 (CVB₃/0), не будучи патогенным по отношению к миокарду мышей контрольной группы (они находились на селенадекватной диете), вызывал кардиальные нарушения у селендефицитных мышей. В то же время заражение вирусом, выделенным от селенодефицитных мышей, здоровых животных влекло за собой появление у них кардиальной патологии [4].

В результате секвенирования вируса Коксаки B_3 после его пребывания в организме Se-дефицитного хозяина были обнаружены мутации в 6 из 7 компонентов вирусного генома, отвечающих за вирулентность [3]. Закономерен вопрос: могут ли происходить подобные модификации генома в условиях Se-дефицита и у других РНК-содержащих вирусов, например, у вируса гепатита С (HCV) или вируса иммунодефицита человека (HIV)?

В литературе можно встретить факты ингибирующего действия селена на мутагенез. Так, частота хромосомных разрывов, индуцируемых $1,6 \text{ мкМ}$ 7,12-диметилбензантрацена (ДМБА), в культурах человеческих лейкоцитов значительно снижалась при добавлении $0,2 \text{ мкМ}$ Na_2SeO_3 , витами-

нов Е и С (по 10 мкМ) и $0,21 \text{ мкМ}$ бутилокситолуола (на 42% ; $31,7\%$; $63,2\%$ и $63,8\%$; соотв.) [6]. Аналогичным образом Na_2SeO_3 влиял на спонтанный мутагенез в культурах дрожжей [5] и мутагенные эффекты, индуцируемые МДА и β -пропиолактоном [7].

Все это поощряет изучение редокс-статуса пациентов, живущих в Se-дефицитных регионах, с различными вирусными инфекциями (и в первую очередь такими, как HIV и HCV, экспансия которых в Латвии носит нарастающий характер). Если в 1997 году в республике было зарегистрировано 4,1 случая впервые выявленной HCV-инфекции (на 100 тыс. населения), то в 2000 году эта цифра составила уже 12,3 (заметим, что средний показатель выявляемости HCV в мире равен 1-3 случая на 100 тыс. населения). Число HIV-инфицированных в Латвии в 2002 году возросло по сравнению с 1998 годом в 3,3 раза, тогда как количество заболевших AIDS за этот срок увеличилось в 5 раз (при этом смертность больных выросла в 4,7 раза). По данным некоторых исследователей, смерть от AIDS у HIV-инфицированных и страдающих селенодефицитом оказывается в 20 раз более вероятной, чем у пациентов с нормальным уровнем Se в организме [2].

По этому представляла интерес обеспеченность селеном, а также NO-продукция и редокс-статус у пациентов (постоянных жителей Латвии) с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) до начала противовирусной терапии.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 48 больных с впервые выявленным ХВГС (25 мужчин и 23 женщины) в возрасте от 24 до 69 лет.

Наряду с клиническими и биохимическими (вирусная нагрузка, аминотрансферазы, билирубин, щелочная фосфатаза, ферритин и др.) показателями определяли уровень Se в плазме (pSe),

активность глутатионпероксидазы эритроцитов (GPx-I), плазменной каталазы (CAT), супероксиддисмутазы эритроцитов (Cu/Zn-SOD), уровень в плазме малонового диальдегида (MDA) и E-витамина (vitE), а также базальную люминолзависимую хемилюминесценцию плазмы (БЛХП) по параметрам: h , s , $tg\alpha$.

Для оценки NO-продукции у 17 больных ХВГС и 14 здоровых лиц (контрольная группа) измеряли концентрацию нитроксильных радикалов в виде парамагнитных мононитрозильных комплексов железа с диэтилдитиокарбаматом (МНКЖ-ДЭТК) методом электронного парамагнитного резонанса на ЭПР-спектрометре (Radiopan, Польша). С этой целью 0,3 мл венозной гепаринизированной крови немедленно после взятия помещали в ампулу с ловушкой NO-радикалов (10 мг натриевой соли диэтилдитиокарбамата) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Затем ампулу с кровью замораживали в жидком азоте ($t^{\circ} = -196^{\circ}C$), извлекали из ампулы образец цилиндрической формы (диаметром 4 мм и длиной 15 мм) и помещали его в кварцевый дьюар с жидким азотом в резонаторе ЭПР-спектрометра для регистрации сигналов ЭПР. Типичный сигнал МНКЖ-ДЭТК, регистрируемый при 77 К, характеризуется значениями $g_{\parallel} = 2,02$ и $g_{\perp} = 2,035$ с триплетной сверхтонкой структурой (СТС). Искомое количество NO-радикалов в образце определялось интенсивностью третьей (высокопольной) компоненты. Результат выражали в условных единицах (u).

Все исследования проводили до начала антивирусной терапии (α -интерферон, рибавирин).

Результаты и их обсуждение

Уровень нитроксильных радикалов (NO-продукция) был достоверно выше у больных ХВГС по сравнению с нормой: ($M \pm m$) $30,3 \pm 3,4 u$ против $25,8 \pm 4,3 u$ ($p < 0,01$). Обращал внимание разброс данных ЭПР-анализа у больных ХВГС в отличие от контрольной группы: коэффициент вариации (CV) у пациентов – 45,7%; у здоровых лиц – 16,7%.

Средний уровень Se в плазме больных ХВГС был у нижней границы нормы – $79,2 \pm 2,7 \mu g/l$; границы колебаний $73,7-84,8 \mu g/l$; норма $80-120 \mu g/l$. Пограничное значение (по отношению к норме) было у средней активности GPx-I: $51,7 \pm 3,3 u/gHb$.

У больных ХВГС отмечалось достоверное снижение по сравнению с нормой активности эритроцитарной Cu/Zn-SOD, которая будучи в среднем $140,9 \pm 3,3 u/ml$, ни в одном случае не достигала нормальной нижней границы (рис. 1). Нормальные

пределы колебаний Cu/Zn-SOD: $164-240 u/ml$.

Заметно превышали норму показатели БЛХП (рис. 2): $h - 153,5 \pm 18,9 u$ (норма $30-80 u$); $s - 447,7 \pm 44,5 mm^2$ (норма не более $250 mm^2$); $tg\alpha - 9,4 \pm 1,1$ (в норме – не более 4,5). В то же время средний уровень MDA в плазме ($3,15 \pm 0,09 nmol/ml$) свидетельствовал об умеренно выраженном прооксидантном сдвиге (рис. 5). Практически не отличались от нормы плазменные показатели vit E.

Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) практически у всех (за исключением одного пациента) кратно превышала норму и составляла в среднем ($M \pm m$): $210,3 \pm 49,7 u/l$, что говорит о заметной роли, которую играет некроз у этих больных в терминальной программе гепатоцитов.

Был сделан линейный корреляционный анализ измеряемых параметров, выявивший заметную позитивную связь между БЛХП (по значениям h) и активностью АлАТ плазмы ($r = 0,38$; $p < 0,05$). В то же время достоверной корреляции между АлАТ и вирусной нагрузкой подтвердить не удалось ($r = 0,06$).

Итак, согласно полученным данным, у больных с впервые выявленным ХВГС и сравнительно низкой (на уровне нижней нормальной границы) обеспеченностью селеном уже в дебюте болезни, который сопровождался высокой (в среднем почти на порядок превосходящей норму) активностью плазменной АлАТ, обнаружено достоверное увеличение NO-продукции (по результатам ЭПР), а также показателей БЛХП и MDA плазмы. Наряду с этим у всех пациентов была снижена активность эритроцитарной Cu/Zn-SOD, что может свидетельствовать об ослаблении внутриклеточной антиоксидантной защиты.

И хотя генез выявленных прооксидантных сдвигов нуждается в дальнейшем уточнении, мы склонны связывать их с переключением смертельной программы гепатоцитов (на фоне HCV-экспансии) с апоптоза на некроз и появлением отчетливых признаков свободнорадикального фагоцитоза с активизацией процессов эндогенной продукции не только кислородных, но и азотных радикалов. Показательна в этом отношении достоверная позитивная корреляция между плазменной АлАТ (как критерия некротической деструкции гепатоцитов) и БЛХП.

В то же время отсутствие достоверной связи активности АлАТ с вирусной нагрузкой (репликацией вируса) свидетельствует о ведущей (определяющей) роли в дальнейшем развитии болезни не вируса, а гепатоцита и защитных систем HCV-

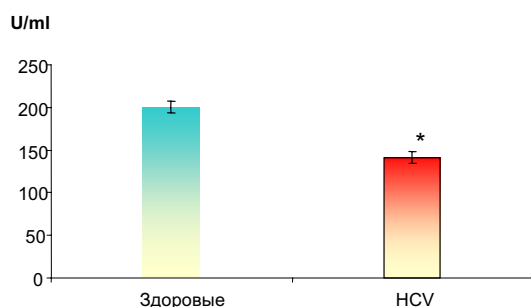


Рисунок 1. Активность Cu, Zn-SOD
(*) различие с нормой достоверно ($p < 0,05$)

инфицированного организма, которые при определенных условиях (как это известно из литературы в отношении No-продуцирующей системы) способны стать деструктивными, приводить к известным осложнениям инфекционного процесса (фиброз, цирроз, рак), демонстрируя тем самым несостоятельность такой защиты, и, в конечном итоге, запускать программу смерти самого «хозяина» (вирусоносителя). Такая возможность, очевидно, не может не учитываться при выборе лечебной тактики у больных ХВГС.

Нельзя исключить также вероятное влияние на редокс-статус наших пациентов их сравнительно низкую обеспеченность селеном, что, на наш взгляд, легко подтвердить (или отвергнуть) после ликвидации селенодефицита с помощью Se-содержащих препаратов.

Требуется коррекция также и обнаруженный у наших больных низкий уровень Cu/Zn-SOD. С этой целью могли бы быть использованы лекарственные средства как содержащие этот фермент, так и обладающие супероксиддисмутазной активностью (например, актовегин).

В целом же приходится признать, что контроль за редокс-статусом пациентов и его коррекция с помощью антиоксидантов (как до, так и во

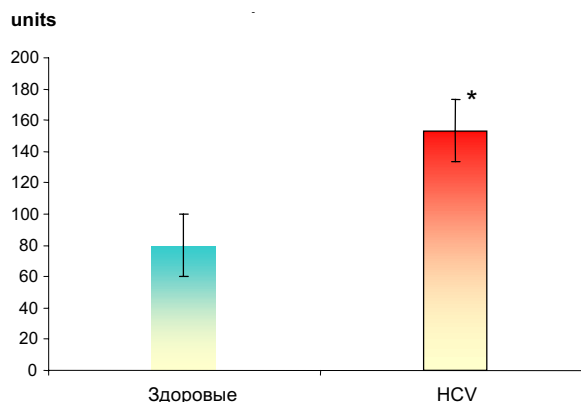


Рисунок 2. Содержание LOO и LOOH в плазме
(*) различие с нормой достоверно ($p < 0,05$)

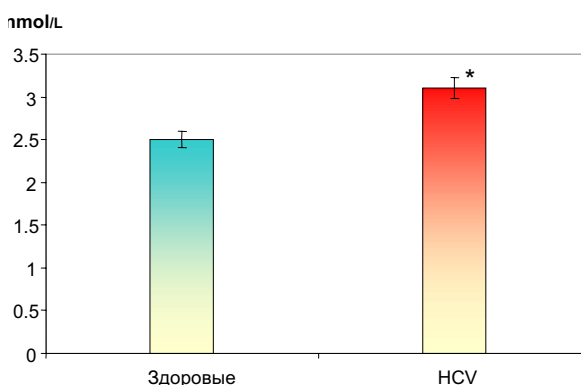


Рисунок 3. Уровень MDA в плазме крови
(*) различие с нормой достоверно ($p < 0,05$)

время противовирусной терапии) сегодня не входят в арсенал диагностических и лечебных мер при ведении больных ХВГС. Хотелось бы надеяться, что такое положение продлится не слишком долго.

Наблюдения за больными и динамикой про-антиоксидантных показателей на фоне проводимой противовирусной терапии (α -интерферон, рибавирин) продолжаются.

Список использованной литературы:

1. Петухов В.И., Манухина Е.Б., Нанчикеева и др. Дефицит железа (Fe) и селена (Se) в России и Латвии: возможное негативное влияние на демографические показатели // Микроэлементы в медицине. – 2003. – №4(2). – С. 1-4.
2. Стрейт Дж. Последствия превышения рекомендуемой суточной дозы микронутриентов: фолиевой кислоты и селена // Вопросы питания. – 2000. – №3. – С. 50-53.
3. Beck M.A., Shi Q., Morris V.C., Levander O.A. Rapid genomic evolution of a non-virulent Coxsackie virus B₃ in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates // Nature Med. 1995. Vol. 1, N 5. P. 433-436.
4. Levander O.A., Beck M.A. Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from Coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E // Biol. Trace Elem. Res. 1997. Vol. 237. P. 5-21.
5. Rosin M.P. Inhibition of spontaneous mutagenesis in yeast cultures by selenite, selenate and selenide // Cancer Lett. 1981. Vol. 13. P. 7-14.
6. Shamberger R.J., Baughman F.F., Kalcberg S.L. et al. Carcinogen-induced chromosomal breakage decreased by antioxidants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. Vol. 70. P. 1461-1463.
7. Shamberger R.J., Corlett C.L., Beaman K.D., Kasten B.L. Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and ?-propiolactone // Mutat. Res. 1979. Vol. 66. P.349-355.