

О.В. Щепилова¹, Г.С. Томилка¹, О.А. Лебедько²

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА В ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАНАХ ПРИ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ А

¹Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;
²Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН-НИИ
охраны материнства и детства, 680000, ул. Воронежская, 49, г. Хабаровск

Резюме

Изучено содержание активированных кислородных метаболитов (АКМ) в эритроцитарных мембранах у больных легкой и среднетяжелой формами вирусного гепатита А (ВГА). Выявлено нарушение процессов свободнорадикального окисления в эритроцитарных мембранах с учетом формы и периода болезни. Установлено, что степень выраженности накопления активированных кислородных метаболитов в мембранах эритроцитов выше у пациентов со среднетяжелой формой гепатита А. В периоде реконвалесценции у больных среднетяжелой формой сохранялось повышение АКМ на фоне угнетения активности системы антиоксидантной антирадикальной защиты. У пациентов с легкой формой ВГА показатели свободнорадикального статуса практически достигали контрольного уровня.

Ключевые слова: вирусный гепатит А, прооксидантно-антиоксидантный статус, мембраны эритроцитов.

O.V. Shchepilova¹, G.S. Tomilka¹, O.A. Lebedko²

EVALUATION OF PROOXIDATION-ANTIOXIDATIVE STATUSES OF ERYTHROCYTES MEMBRANES IN VIRAL HEPATITIS A

¹Far Eastern State medical University;
²Khabarovsk region affiliate research center of respiration physiology and pathology, Khabarovsk

Resume

The authors have studied the content of activated oxygen metabolites (AOM) in erythrocyte membranes in patients with mild and moderate hepatitis A. (VHA) Disorders of free radical oxidation process in erythrocyte membrane depending on the form and the period of the disease was revealed. The level of active oxygen metabolites accumulation in erythrocyte membrane is higher in patients with a moderate form of hepatitis A. In the period of recovery patients with a moderate severity of the disease demonstrated an increased level of AOM at the back ground of antioxidant antiradical defense deterioration. In patients with a mild form of the disease free radical status almost reached the control level.

Key words: viral hepatitis A, prooxidant-antioxidant status, erythrocyte membrane.

В настоящее время установлено, что ведущим в патогенезе гепатита А является развитие воспалительных и некробиотических процессов в перипортальной зоне печеночных долек и портальных трактов [9, 13]. Эти изменения сопровождаются нарушением биогенеза активированных кислородных метаболитов, истощением системы антиоксидантной антирадикальной защиты (АОРЗ) и развитием системного оксидативного стресса [9, 11].

Согласно данным литературы свободнорадикальное окисление происходит в любой клетке и различных мембранных структурах, в том числе гепатоцитах и эритроцитах [1, 4, 5, 6].

Общие принципы молекулярной организации плазматической мембраны эритроцитов, общие закономерности реагирования клеток на разнообразные патогенные воздействия и развертывания типовых патологических процессов, реализуемых по единому сценарию [2, 7] явились предметом нашего исследования, так как ее повреждение может свидетельствовать о повреждении АКМ гепатоцитов.

Данные литературы свидетельствуют о неоднородности трактовки изменений свободнорадикально-

го статуса в сыворотке крови и эритроцитах при вирусных гепатитах в зависимости от степени тяжести и периода болезни [3, 6, 10].

В доступной литературе мы не встретили данных по изучению свободнорадикального окисления и системы АОРЗ с помощью хемилюминесцентного (ХМЛ) анализа в эритроцитарных мембранах у больных гепатитом А в зависимости от тяжести течения.

Материалы и методы

В соответствии с поставленными задачами нами были обследованы 35 больных с клинически манифестной формой гепатита А, находившиеся на лечении в клинике инфекционных болезней Дальневосточного государственного медицинского университета на базе МБУЗ «Городская клиническая больница № 10».

Первая группа – 16 больных с легкой формой ГА. Средний возраст 23,71±2,55 года, из которых 9 мужчин и 7 женщин.

Вторая группа – 19 больных со среднетяжелой формой ГА. Средний возраст 25,71±2,15 года, из которых 11 мужчин и 8 женщин.

Все больные получали базисную терапию, включающую диету № 5 по Певзнеру, витамины, а при среднетяжелой форме внутривенную инфузию 5 % раствора глюкозы.

Группу сравнения составили 14 практически здоровых людей (доноры Хабаровской краевой станции переливания крови).

Исследуемые группы были относительно однородными и сопоставимыми по возрасту, полу, биохимическим изменениям и клиническим проявлениям.

Диагноз вирусного гепатита А установлен на основании обнаружения специфических маркеров (анти-HAV IgM) в 100 % случаев и отсутствии маркеров других гепатитов.

Для интегральной оценки процессов свободно-радикального окисления (СРО) использовали метод хемилюминесценции (ХМЛ). Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS-50В фирмы «PERKIN ELMER» (Швейцария). Стандартизацию сигнала и математическую обработку кривых выполняли с помощью встроенной программы «Finlab».

Изучали кинетику ХМЛ в присутствии люминола, инициированную перекисью водорода (H_2O_2) в эритроцитарных мембранах по методикам, описанных нами ранее [12]. Анализировали следующие параметры: светосумму люминол-зависимого свечения в течение 1 мин. (S_3), величина которой коррелирует с содержанием гидроксильных радикалов; максимум инициированного перекисью водорода свечения (Н), величина которого обратна перекисной резистентности биосубстрата; светосумму инициированного перекисью водорода свечения за 2 мин. (S_4), величина которой обратна активности антиоксидантной антирадикальной защиты (АОРЗ). Интенсивность ХМЛ выражали в относительных единицах.

Мембраны эритроцитов выделяли по методу Л.И. Апуховской и соавт. (1978).

Исследование ХМЛ-параметров прооксидантно-антиоксидантного статуса проводили в ЦНИЛе ДВГМУ (зав. лабораторией, засл. деятель науки РФ, доктор мед. наук, профессор С.С. Тимошин).

Для оценки скорости функционального восстановления печени определяли темп восстановления показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса в сыворотке крови и эритроцитарных мембранах. Для оценки достоверности различий и статистической значимости изменений в группах сравнения, учитывая различия дисперсий в выборках, использовался тест Саттервайта. В соответствии с предложенной методикой рассчитывалось откорректированное значение степеней свободы (df), опирались на первое значение t-критерия Стьюдента.

Достоверность различий между сравниваемыми группами оценивали по значимости средних значений показателей с помощью t-критерия Стьюдента. Выявляемые различия считали достоверными при величине $p < 0,05$. Статистическую обработку проводили на IBM PC, Intel Pentium IV, с использованием пакета прикладных программ для статистической обработки данных «Microsoft Excel 2000», Statistica 6.0 (Basic Statistics / Tables).

Результаты и обсуждение

Изучено состояние прооксидантно-антиоксидантного статуса в эритроцитарных мембранах у больных легкой и среднетяжелой формой ГА в периоде разгара заболевания (при поступлении), в периоде реконвалесценции (при выписке из стационара) и в сравнении с контролем.

У больных легкой формой ГА установлено повышение активности свободнорадикальных процессов в эритроцитарных мембранах в виде повышения концентрации гидроксильных радикалов (S_3) в 1,81 раза ($p < 0,001$) относительно контрольного уровня. Эти данные сочетались с ослаблением АОРЗ (S_4) в 1,83 раза ($p < 0,001$), в том числе за счет снижения резистентности организма к перекисному окислению (Н), о чем свидетельствовало угнетение активности каталазы в виде увеличения амплитуды (Н) в 1,79 раза ($p < 0,001$) (табл. 1).

В сравнении с контрольной группой у больных среднетяжелой формой зарегистрировано усиление активности свободнорадикальных процессов в эритроцитарных мембранах в виде повышения содержания гидроксильных радикалов (S_3) в 2,56 раза ($p < 0,001$). Это сочеталось с ослаблением активности системы АОРЗ (S_4) в 2,22 раза ($p < 0,001$) и снижением резистентности организма к перекисному окислению (Н), о чем свидетельствовало угнетение активности каталазы в виде увеличения (Н) в 3,05 раза ($p < 0,001$) (табл. 1).

Проведен сравнительный анализ показателей свободнорадикального статуса в эритроцитарных мембранах у больных гепатитом А в зависимости от степени тяжести и периода болезни (табл. 1).

Таблица 1

Показатели прооксидантно-антиоксидантного статуса эритроцитарных мембран у больных легкой и среднетяжелой формами гепатита А при поступлении

Показатель	Контроль (n=14) (p ₁)	При поступлении		p
		легкая форма (n=16) (p ₂)	среднетяжелая форма (n=19) (p ₃)	
S_3 (отн. ед.)	0,52±0,06	0,94±0,05	1,33±0,09	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$
Н (отн. ед.)	0,62±0,07	1,11±0,07	1,89±0,13	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$
S_4 (отн. ед.)	1,09±0,12	2,0±0,12	2,42±0,13	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,05$

У пациентов со среднетяжелой формой показатель средних значений концентрации гидроксильных радикалов (S_3) выше в 1,41 раза ($p < 0,001$), чем при легкой форме. Снижение активности антиоксидантной антирадикальной защиты (S_4) у больных среднетяжелой формой выше в 1,21 раза ($p < 0,05$) в сравнении с легкой. Это сопровождалось снижением устойчивости субстрата к перекисному окислению (Н) в 1,70 раза больше, чем в группе сравнения ($p < 0,001$).

В периоде реконвалесценции показатели свободнорадикального статуса у больных легкой формой практически достигали контрольного уровня ($p > 0,05$), а у пациентов со среднетяжелой формой оставались достоверно выше контроля ($p < 0,001$) (табл. 2).

Таблица 2

Показатели прооксидантно-антиоксидантного статуса эритроцитарных мембран у больных легкой и среднетяжелой формами гепатита А при выписке

Показатель	Контроль (n=14) (p ₁)	При выписке		p
		легкая форма (n=16) (p ₂)	среднетяжелая форма (n=19) (p ₃)	
S ₃ (отн. ед.)	0,52±0,06	0,65±0,04	0,99±0,14	p ₁₋₂ >0,05 p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,05
H (отн. ед.)	0,62±0,07	0,78±0,03	1,42±0,16	p ₁₋₂ >0,05 p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001
S ₄ (отн. ед.)	1,09±0,12	1,19±0,10	2,04±0,24	p ₁₋₂ >0,05 p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ <0,01

При этом значения S₃, S₄ и H были выше в 1,52 – (p<0,05), 1,71 – (p<0,01) и 1,82 (p<0,001) раза, чем у больных легкой формой, соответственно.

Ранее мы характеризовали процессы свободнорадикального окисления сыворотки крови у больных ГА с учетом формы и периода болезни. Нами обнаружено статистически достоверное повышение всех ХМЛ-показателей сыворотки крови по отношению к аналогичным показателям в эритроцитарных мембранах.

При изучении связей между показателями свободнорадикального статуса в сыворотке крови и эритроцитарных мембранах определена достоверная сильная положительная корреляция между устойчивостью субстрата к перекисному окислению (H) эритроцитов и интенсивностью процессинга АКМ (S₁) сыворотки крови (r=+0,81, p<0,001) и средней силы отрицательная связь между (H) в эритроцитарных мембранах и АлАТ (r=-0,50, p<0,05).

Изучен темп восстановления показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса в эритроцитарных мембранах у больных с легкой формой гепатита А (табл. 3).

Таблица 3

Темп восстановления показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса в эритроцитарных мембранах у больных легкой формой гепатита А

Показатель	Темп восстановления показателей (n=16)		p
	за 1 день	за 17 дней	
S ₃	1,8 %	30,8 %	p<0,001
H	1,7 %	29,6 %	p<0,01
S ₄	2,4 %	40,5 %	p<0,001

Темп восстановления изученных показателей высокозначимый. Можно предположить, что это связано с незначительным повышением изученных показателей в периоде разгара заболевания, отсутствием значительного усиления интенсивности процессов свободнорадикального окисления и снижением активности системы АОРЗ в эритроцитарных мембранах, что может свидетельствовать об эффективной антиоксидантной антирадикальной защите при легкой форме гепатита А.

За 21 день лечения больных среднетяжелой формой ВГА выявлено незначительное (p>0,05) снижение продукции гидроксильных радикалов (S₃) на 25,6 %, при слабом (p>0,05) усилении АОРЗ (S₄) на 15,7 %, в

том числе за счет незначительного (p>0,05) повышения устойчивости субстрата к перекисному окислению на 24,8 % (табл. 4).

Таблица 4

Темп восстановления показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса в эритроцитарных мембранах у больных среднетяжелой формой гепатита А за 21 день базисной терапии

Показатель	Темп восстановления показателей (n=19)		p
	за 1 день	за 21 день	
S ₃	1,2 %	25,6 %	p>0,05
H	1,2 %	24,8 %	p>0,05
S ₄	0,7 %	15,7 %	p>0,05

Учитывая универсальность молекулярных механизмов повреждения клеточных мембран, более медленную нормализацию показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса в эритроцитарных мембранах, можно предположить о снижении темпа нормализации показателей свободнорадикального статуса в гепатоцитах при среднетяжелой форме ГА.

Выявлены достоверные положительные связи между содержанием гидроксильных радикалов (S₃) в эритроцитах и АлАТ (r=+0,48, p<0,05), между содержанием гидроксильных радикалов (S₃) в эритроцитах и общим билирубином (r=+0,52, p<0,05), между устойчивостью субстрата к перекисному окислению (H) в эритроцитах и общим билирубином (r=+0,45, p<0,05), между устойчивостью субстрата к перекисному окислению (H) в эритроцитах и АлАТ (r=+0,42, p<0,05).

Сравнительный анализ темпа восстановления показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса в эритроцитарных мембранах у больных легкой и среднетяжелой формой гепатита показал, что у пациентов с легкой формой темп восстановления показателей быстрее, чем у больных со среднетяжелой формой, поэтому при выписке из стационара изученные показатели при легкой форме достигали контрольного уровня.

Таким образом, степень выраженности процессов накопления АКМ на фоне снижения активности АОРЗ на мембранном уровне больше у больных со среднетяжелой формой ГА.

Свободнорадикальное повреждение является одним из основных механизмов дестабилизации плазматических мембран, в том числе и гепатоцитов. Сохранение повышенных уровней ХМЛ-показателей свободнорадикального статуса у больных среднетяжелой формой гепатита А при выписке из стационара свидетельствует о декомпенсированном образовании свободных радикалов на фоне угнетения активности антиоксидантной антирадикальной системы защиты, продолжении патологического процесса и предполагает назначение антиоксидантной терапии при среднетяжелой форме гепатита А.

Выводы

1. У больных легкой и среднетяжелой формами ГА выявляется усиление интенсивности процессов свободнорадикального окисления и угнетение активности антиоксидантной антирадикальной защиты организма на мембранном уровне.

2. У больных ГА среднетяжелой формой, остается достаточно высокая интенсивность процессов свободнорадикального окисления на фоне снижения активности антиоксидантной антирадикальной защиты крови к моменту выписки из стационара.

3. Темп восстановления показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса в эритроцитарных

мембранах у больных легкой формой выше, чем при среднетяжелой форме гепатита А.

4. Существенное угнетение показателей антиоксидантной антирадикальной защиты в период разгара болезни предполагает включение антиоксидантов в комплексную терапию больных гепатитом А.

Литература

1. Бугаев А.О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол, колопроктол. – 2002. – № 4. – С. 21–25.

2. Васильева Е.М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51. – Вып. 2. – С. 118–126.

3. Дудина А.В. Острые вирусные гепатиты А и В: обоснование применения селективной фотохромотерапии // Автореферат дисс. канд. мед. наук. – СПб, 2008. – 23 с.

4. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты – М. : Слово, 2006. – 553 с.

5. Молочный В.П., Новик Е.С., Лебедево О.А. Оценка параметров свободнорадикального окисления в ликворе и крови у детей с менингококковым менингитом // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2007. – № 1. – С. 59–62.

6. Нагоев Б.С., Иванова М.Р. Роль системы антиоксидантной защиты организма в патогенезе острых вирусных гепатитов // Терапевтический архив. – 2003. – № 11. – С. 15–17.

7. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. и др. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов

при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 2. – С. 62–69.

8. Плеханова Н.Г., Сомова Л.М. Физиологическая роль оксида азота при инфекционном процессе // Успехи физиологических наук. – 2012. – Т. 43. – № 3. – С. 62–81.

9. Подымова С.Д. Болезни печени. Руководство для врачей. – М. : Медицина, 2005. – 767 с.

10. Савченко И.В., Савченко И.О., Нагайцев А.В. и др. Особенности перекисного окисления липидов у больных хроническими вирусными гепатитами // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 2. – С. 35–37.

11. Скворцов В.В. Антиоксидантный эффект внутривенного лазерного облучения крови у больных хроническими диффузными заболеваниями печени // Гепатология. – 2003. – № 4. – С. 10–12.

12. Щепилова О.В., Томилка Г.С., Лебедево О.А. Оценка эффективности даларгина при вирусном гепатите А по темпу функционального состояния печени // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2010. – № 17 – С. 57–63.

13. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Лекции по инфекционным болезням. – М. : Медицина, 2007. – 1032 с.

Координаты для связи с авторами: Щепилова Ольга Валериевна – ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ДВГМУ, e-mail: Olga27.64@mail.ru; Томилка Геннадий Степанович – доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ДВГМУ, тел. 8-(4212)-30-53-11; Лебедево Ольга Антоновна – доктор мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, тел. 8-(4212)-980-591, e-mail: iomid@yandex.ru.

