

### MICROELEMENTELE ȘI ENZIMELE ANTIOXIDANTE LA PACIENȚII CU HEPATITĂ CRONICĂ VIRALĂ C

Vlada-Tatiana Dumbrava, Svetlana Maev

Catedra Medicină Internă №4, Laboratorul Gastroenterologie USMF „Nicolae Testemițanu”

#### Summary

##### *Antioxidant enzymes and microelemets in chronic viral hepatitis C patients*

The study involved 102 chronic viral hepatitis C patients to whom there was determined the concentration of Cu, Zn and Ceruloplasmine depending on the viral infection phase (reactivation, latent phase) and on the activity of the hepatic inflammatory process. The investigation results revealed high concentrations of Cu and Ceruloplasmine in both phases of viral C infection and high level of Cu in patients with a moderate-maximum activity of the hepatic inflammatory process comparative to patients with a minimum activity.

#### Rezumat

Studiul a cuprins 102 pacienți cu hepatită cronică virală C, la care s-au apreciat concentrația Cu, Zn și a ceruloplasminei în dependență de faza infecției virale (reactivare, latentă) și activitatea procesului inflamator hepatic. Rezultatele investigațiilor au pus în evidență concentrații sporite a cuprului și ceruloplasminei la bolnavii în ambele faze a infecției virale C și nivel sporit al cuprului la bolnavii cu activitatea moderat-maximală a procesului inflamator hepatic, comparativ cu bolnavii cu activitate minimală.

#### Actualitatea temei

Infecția virală C este problemă de sănătate publică la nivel mondial. Din datele epidemiologice ale OMS se apreciază, că la scară mondială infecția virală C afectează 3% din populație, ce constituie aproximativ 170 milioane subiecți. VHC provoacă leziuni hepatice direct, prin mecanism citopatic și indirect, mediat imunologic. Deaceea, evoluția hepatitei cronice virale C depinde atât de patogenitatea virusului cât și de reactivitatea imunologică a organismului.[5]

Persistența virusului C este legată de factorii ce depind de virus cât și de gazdă: prezența steatozei, consumul de alcool, diabetul zaharat- acești factori sunt bine determinați ca fiind comorbizi și de progresie în hepatita cronică virală tip C. Dereglarea homeostaziei microelementelor (Cu, Zn) și intensificarea peroxidării lipidelor, însoțite de acumularea sporită a produselor oxidării peroxidice a lipidelor și depresia sintezei glutationului, conduc în consecință la predominarea proceselor de oxidare cu formarea excesivă a radicalilor liberi, asupra sistemului antioxidant, având astfel un efect direct citopatic în hepatita cronică virală C. Speciile reactive de oxigen, produse de celulele macrofage activate și aldehydele reactive rezultate din peroxidarea lipidică au o acțiune activatoare asupra celulelor hepatice stelate, pe care le transformă în miofibroblaști, favorizând sinteza de matrice extracelulară, fibroza și ciroza. Reacțiile oxidative favorizează eliberarea din celulele Kupfer a citokinelor profibrogenetice TGF-β. [5,8]

Există studii care sugerează utilizarea în tratamentul bolnavilor cu hepatită virală C, a Cu Zn superoxidismutazei, care scade expresia TGF-β, astfel încetinind fibrogeneza și progresarea hepatitei cronice și influențând astfel pronosticul maladiei. [4]

În organismul uman microelementele intră în componența diversilor compuși biologic activi. Cuprul intră în componența următoarelor enzime: ceruloplasmina, superoxidismutaza, dopaminhidroxilaza, uratoxidaza, citocromoxidaza, tirozinaza etc. Una dintre cele mai importante este ceruloplasmina - care este o proteină multifuncțională cu rol în homeostaza cuprului și cu rol

de reactant de fază acută în procesul inflamator, ce apără membranele lipidice de oxidarea peroxidică. După datele cercetărilor cristalografice molecula de ceruloplasmină conține 6 ioni de cupru. Concentrația ceruloplasminei în sânge crește în cazul: inflamației, infecțiilor, în rezultatul activării transcripției genei ceruloplasminei indusă de  $\gamma$ -interferon și citochine. Receptori pentru ceruloplasmină au fost depistați pe celulele aortei și cordului, eritrocitelor, monocite și limfocite, endoteliul ficatului și celulele Kupffer.

Ionii de cupru fiind captați de către enterocite pătrund în patul sanguin, aflându-se în complecși cu proteinele serice, peptidele și aminoacizii, pătrund în hepatocite cu ajutorul transportorului de cupru (hCtr1), activitatea căruia este inhibată de către ionii  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ . În citoplasmă, ionii de cupru se află în complex cu glutatationul, care preîntâmpină acțiunea toxică a formelor active al oxigenului.

Alt microelement esențial pentru organismul uman este zincul. În organismul adultului se găsește cca 1,8g zinc. Zincul îndeplinește roluri structurale și funcționale datorită faptului că intră în componența mai multor metaloenzime implicate în toate categoriile de metabolisme. Din metaloenzimele cu zinc, fac parte: superoxidismutaza, anhidraza carbonică, lactatdehidrogenaza, glutamatdehidrogenaza, fosfataza alcalină, timidinkinaza. [10]

Perturbările în echilibrul cuprului și zincului în organismul uman, au ca urmare sinteza deficientă a antioxidanților hepatici, în special a ceruloplasminei și CuZnsuperoxidismutazei, care protejează hepatocitele de acțiunea nefavorabilă a radicalilor liberi, ce au efect direct citopatic în hepatita cronică virală C[2,4,5].

### **Scopul lucrării**

Aprecierea concentrației microelementelor (Cu, Zn) și a ceruloplasminei în serul bolnavilor cu hepatită cronică virală C (HCV C) în dependență de stadiul infecției virale C și activitatea procesului inflamator hepatic.

### **Materiale și metode de cercetare**

Studiul a cuprins 102 pacienți cu hepatită cronică virală C. Repartizarea bolnavilor în loturi a fost efectuată în conformitate cu următoarele principii: *în funcție de faza infecției virale (faza de reactivare și faza latentă); în funcție de gradul activității procesului inflamator hepatic, bolnavii au fost divizați: grad minimal și grad moderat-maximal.*

Caracteristica clinică a pacienților s-a efectuat în baza următoarelor sindroame clinice: asteno-vegetativ, dispeptic, algic și simptome: hepatomegalie, splenomegalie, semnele de hipertensiune portală. Pentru evaluarea gradului de alterare hepatică s-a efectuat un complex de teste ce reflectă *sindromul citolitic* (ALT, AST), *colestatic* (bilirubină totală și conjugată, fosfataza alcalină, colesterolul total, gama –glutamiltranspeptidaza, *hepatopriv* (proteina generală, albumina, indicele protrombinic), *sindromul imuno-inflamator* (analiza generală a sângelui, nivelul de imunoglobulină IgA, IgM, IgG, CIC, limfocitele T totale și subpopulațiile lor: T act., T tfs., și T tfr. prin metoda rozetării cu teofilină). În scopul constatării etiologiei HCV s-au determinat marcherii hepatitelor virale B, C, D. Pentru detecția *marcherilor de hepatite virale* s-a utilizat metoda analizei imunoenzimatic: anti HCVsumar a fost apreciat prin folosirea ELISA generația IV, iar ceilalți anticorpi (anti HBs, anti HBcor sumar, anti HBcor IgM, anti HCV IgM, anti D sumar, anti D IgM) – prin ELISA generația VI. ARN HCV a fost apreciat prin reacția de polimerizare în lanț prin metoda calitativă și cantitativă.

Faza infecției virale C a fost apreciată după următoarele criterii: *faza latentă a infecției HCV* - prezența anticorpilor anti HCV sumari (anti HCV IgM negativi), ARN HCV negativ. În *faza de reactivare a infecției virale*- prezența anticorpilor anti HCV IgM, ARN HCV pozitiv.

Determinarea concentrației microelementelor și enzimelor antioxidante a fost efectuată prin metoda spectrofotometriei cu ajutorul analizatorului „Rayto”.

Cercetarea *statutului funcțional al ficatului* s-a completat prin efectuarea ecografiei abdominale cu determinarea ecostructurii parenchimului și dimensiunilor ficatului, splinei și a ECO doppler, cu aprecierea dimensiunilor venei porte și venei splenice. De asemenea diagnosticul s-a confirmat prin utilizarea gama-scintigrafiei hepatosplenice cu izotop de  $Tc^{99}$ .

Lotul martor a fost constituit din 20 persoane practic sănătoase, fără anamneză ereditară agravată, în absența patologiei hepatice și gastrointestinale, bolilor sistemului cardiovascular și țesutului conjunctiv, a dereglărilor autoimune și endocrine.

### Rezultatele obținute

Analiza datelor conform criteriului de vîrstă și sex au arătat, că în lotul de studiu vîrsta medie a constituit  $42,21 \pm 2,04$  ani. Din numărul total de bolnavi, persoanele de gen feminin au constituit 55,9% (n=57), iar de gen masculin- 44,1% (n=45).

Bolnavii cu HCV C au fost divizați în 2 loturi de bază. I lot (n=68) a fost alcătuit din pacienți cu faza de reactivare a virusului C și II lot (n=34) a fost alcătuit din bolnavi cu faza latentă a infecției virale C.

În baza cercetărilor efectuate s-a stabilit o concentrație mai înaltă a cuprului(Cu) la bolnavii cu faza replicativă a infecției virale C-  $41,27 \pm 6,0 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ ), cît și la bolnavii cu faza latentă a infecției virale-  $35,15 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ ), comparativ cu lotul martor-  $15,96 \pm 3,01 \mu\text{mol/l}$ .

Aprecierea concentrației zincului (Zn) la bolnavii cu HCV C ( $11,20 \pm 4,5 \mu\text{mol/l}$ ), comparativ cu lotul martor ( $11,72 \pm 2,12 \mu\text{mol/l}$ ) nu a arătat diferențe semnificative statistice, însă analiza rezultatelor obținute a depistat la 47% (n=48) dintre bolnavii examinați nivel scăzut al Zn comparativ cu lotul martor. Valori crescute ale zincului comparativ cu lotul martor au fost constatate la 21,5% (n=22), ceea ce denotă o tendință de scădere a concentrației Zn la bolnavii cu hepatită cronică virală C.

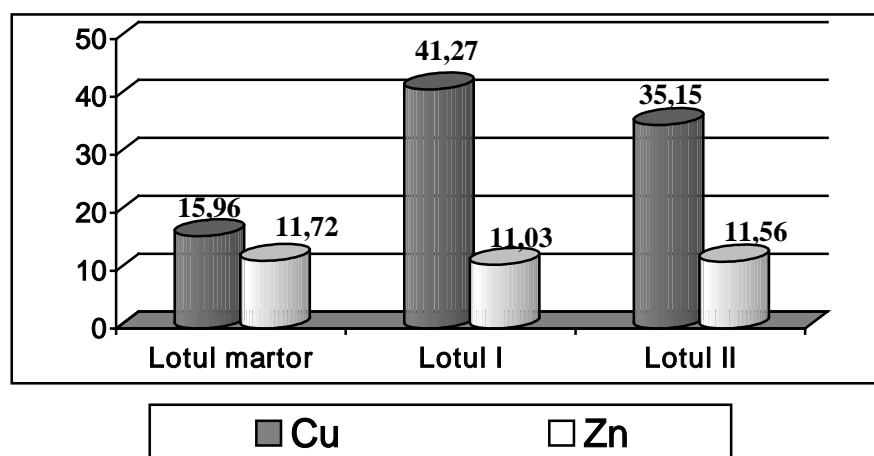


Figura 1. Concentrația microelementelor: cupru(Cu), zinc(Zn) la bolnavii cu hepatită cronică virală C în dependență de faza infecției virale

În rezultatul studiului s-a remarcat *hipertransaminazemie* în ambele loturi de pacienți. În I lot: ALT –  $107,68 \pm 10,0 \text{ Un/l}$  ( $p < 0,001$ ), AST –  $71,43 \pm 15,4 \text{ Un/l}$  ( $p < 0,01$ ); II lot: ALT –  $61,88 \pm 4,5 \text{ Un/l}$  ( $p < 0,001$ ), AST –  $45,7 \pm 4,6 \text{ Un/l}$  ( $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul martor: ALT –  $29,52 \pm 1,8 \text{ Un/l}$ , AST –  $20,62 \pm 1,7 \text{ Un/l}$ .

După gradul activității procesului hepatic, bolnavii au fost divizați în: activitate minimală- 74,5% (n=76) și activitate moderat-maximală -25,5% (n=26). La bolnavii cu activitate moderat-maximală au fost depistate concentrații crescute a Cu-  $45,63 \pm 3,62 \mu\text{mol/l}$ , comparativ cu bolnavii cu activitate minimală -  $36,37 \pm 2,20 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,05$ ), și comparativ cu persoanele sănătoase din lotul martor  $15,96 \pm 3,01 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ ).

Studierea concentrației enzimelor antioxidante hepatice a pus în evidență concentrații crescute a ceruloplasminei la bolnavii din I lot -  $177,45 \pm 14,36 \text{ mg/l}$  ( $p < 0,01$ ), și la cei din II lot -  $186,64 \pm 14,84 \text{ mg/l}$  ( $p < 0,001$ ), comparativ cu lotul martor ( $116,42 \pm 11,87 \text{ mg/l}$ ).

## Discuții

Datele prezentate au pus în evidență dezechilibrul în homeostazia microelementelor la pacienții cu HCV C în ambele faze virale, atât în cea replicativă cât și în cea latentă.

Acțiunea concentrațiilor sporite ale cuprului (hipercupremia) este puțin studiată în plan patogenetic. Cuprul fracției albuminice este ușor accesibil pentru țesuturi, astfel aflându-se în cantități sporite, treptat se acumulează în ele, provocând o serie de procese patochimice, cum ar fi: inhibarea ATP-zei membranare, precum și a unor enzime și cofactori ce conțin grupuri sulfhidril (glutation, acid lipoic), ce la rândul său duce la încetinirea oxidării în țesuturi a acidului piruvic și altor metaboliți ai metabolismului glucidic. [ 1,5]

În calitatea sa de prooxidant, cuprul catalizează procesul de formare a radicalilor liberi și declanșează procesul de oxidare peroxidică a lipidelor. Aceasta în consecință duce la deteriorarea membranei plasmatică și membranei mitocondriilor, pătrunderea enzimelor lizosomale în celulă, dereglarea funcționării ADN-ului și a proteinelor, scăderea concentrației de antioxidanți. Dialdehidul malonic, format în urma oxidării peroxidice a lipidelor, stimulează sinteza colagenului, favorizând astfel procesul de fibrogeneză. [ 1,4]

Intr-un studiu efectuat de Бакулин И.Г. și coaut. în 2006, pe un lot de 102 pacienți, au fost apreciate concentrațiile microelementelor în serul bolnavilor cu hepatită cronică virală C, care au pus în evidență niveluri crescute ale cuprului seric, care este considerat ca un criteriu prognostic nefavorabil de evoluție spre ciroza hepatică și totodată au fost depistate concentrații scăzute ale zincului, care poate fi considerat ca un criteriu de evoluție aspre steatoză hepatică non-alcoolică. [ 12]

Ipoteza că virusul hepatitic C este nemijlocit implicat în dezechilibrul microelementelor este confirmată de cercetările recente în studierea detaliată a structurii genomului VHC [ 3,6,7,10]. Un interes sporit în ultimul timp este manifestat față de peptidul p7 (viroporina), care este localizat la joncțiunea dintre proteinele structurale (core, E1, E2) și cele non-structurale (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). P7 conține 63 aminoacizi, ce formează 2 segmente transmembranare hidrofobe, care sunt unite printr-un sector hidrofil scurt. Ca urmare a procesului de oligomerizare a proteinei p7, se formează un por heptamer. [ 6,11]

Viroporina p7 funcționează pe membranele artificiale ca un canal ionic cation-selectiv de dimensiuni medii. La baza acțiunii lor toxice, se află dereglarea homeostazei ionice celulare și balanța ei osmotică. Ca urmare apare citoliza și necroza țesuturilor. Chiar dacă, celula este capabilă să reziste în urma disbalanței osmotice, creșterea concentrației unor ioni în citoplasmă, poate conduce la alte consecințe dramatice- declanșarea proceselor de exocitoză, endocitoză sau apoptoză.

Mutațiile peptidului p7 în genomul viral, pot duce la scăderea producerii virionilor, dar nu influențează infecțiozitatea, ceea ce indică asupra faptului, că proteina p7 este necesară în stadiile tardive a replicării virale și nu participă la etapa de pătrundere a virusului în celula gazdă. Astfel, viroporina p7 reprezintă o posibilă țintă pentru terapia antivirală, în cazul pacienților cu hepatită C. [ 6,7,11]

Putem presupune că modificările depistate în cadrul studiului efectuat, sunt provocate atât de VHC, cât și de factorii ce țin de gazdă, dar posibil și de factorii mediului ambiant.

Variația largă a condițiilor geografice, acțiunea exprimată a condițiilor de repartizare și migrare a microelementelor a dus la variație largă a concentrației lor în solul diferitor regiuni: de la insuficiență la surplus. După datele lui Chiriliuc V.P., în solurile Moldovei se constată concentrații crescute a 14 elemente chimice (B, Zn, Pb, Mo, Sr, Co, Cu etc.) și este scăzut nivelul a 10 elemente (Bo, Be, Cr, Mn, V etc.), ce este cauzat de condițiile geochimice de formare a teritoriului Moldovei. Poluarea solurilor Moldovei decurge mai lent comparativ cu Europa și este mai exprimată după conținutul Ag, Cu, Pb, ce sunt crescute de 5-15 ori comparativ cu valorile medii. Compușii de cupru (Cuprozan, Carbonatul de cupru, Cuprocin 1 și 2, Triclorfenolatul de cupru etc.) sunt utilizați pe larg în silvicultură și viticultură. [ 13,14]

Nu este posibil de a exclude din viața cotidiană substanțele poluante, dar este posibil, după studierea minuțioasă a toxicității anumitor elemente chimice de monitorizat utilizarea

corectă și rațională a lor. Pentru fiecare element chimic există anumite limite de concentrații, trecând de care elementul „util” poate deveni toxic. Deaceia, clasificarea unui sau altuia element chimic în grupul celor toxice poate fi relativă și poate relate doar, probabilitate înaltă de a acționa negativ asupra organismului uman în lumea contemporană.

Dezechilibrul în statutul microelementelor, are ca consecință afectarea sistemului antioxidant hepatic, care poate influența nefavorabil evoluția hepatitei cronice.

### Concluzii

1. Hepatita cronică virală C decurge cu concentrații evident sporite ale cuprului seric în ambele faze ale infecției virale C: în faza replicativă-  $41,27 \pm 6,0 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ ), cât și la bolnavii cu faza latentă a infecției virale-  $35,15 \pm 8,2 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ ), comparativ cu lotul martor-  $15,96 \pm 3,01 \mu\text{mol/l}$ .
2. Concentrații sporite ale cuprului au fost depistate la bolnavii cu activitate moderat-maximală a procesului inflamator hepatic-  $45,63 \pm 3,62 \mu\text{mol/l}$  comparativ cu bolnavii cu activitate minimală  $-36,37 \pm 2,20 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,05$ ) și comparativ cu persoanele sănătoase din lotul martor  $-15,96 \pm 3,01 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,001$ ).
3. Nivelul ceruloplasminei a fost constatat ridicat la bolnavii în ambele faze ale infecției virale C: la bolnavii cu faza replicativă  $-177,45 \pm 14,36 \text{ mg/l}$  ( $p < 0,01$ ), și la cei cu faza latentă- $186,64 \pm 14,84 \text{ mg/l}$  ( $p < 0,001$ ), comparativ cu lotul martor  $116,42 \pm 11,87 \text{ mg/l}$ .

### Bibliografie

1. Afridi H.I. et al. Determination of copper and iron in biological samples of viral hepatitis (A-E) female patients. *Biol Trace Elem Res.* 2009 Summer;129(1-3):78-87. Epub 2008 Dec 23.
2. Cesur S., Cebeci S.A., Kavas G.O. et al. Serum copper and zinc concentrations in patients with chronic hepatitis C. *J. Infect*, 2005, 51 (1): 35-7.
3. Chew C.F. et al. Determination of pore-lining residues in the hepatitis C virus p7 protein. *Biophys J.* 2009 Jan;96(2):L10-2.
4. Emerit J., Samuel D., Pavio N. Cu-Zn super oxid dismutase as a potential antifibrotic drug for hepatitis C related fibrosis. *Biomed Pharmacother.* 2006 Jan;60(1):1-4. Epub 2005 Oct 25.
5. Grigorescu M. Radu C., Olinicici C.D. Hepatita cronică virală C în *Tratat de hepatologie*, sub redacția M. Grigorescu. Editura medicală națională. București, 2004: 410-458.
6. Patargias et al. Protein-Protein Interactions: Modeling the Hepatitis C Virus Ion Channel p7. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, Vol. 49, No. 2, p.648-655
7. Pérez-Berná Ana J. Et al. Identification of the Membrane-active Regions of Hepatitis C Virus p7 Protein. *Biophysical characterization of the loop region. J. Biol. Chem.*, Vol. 283, Issue 13, 8089-8101, March 28, 2008
8. Rigamanti C., Andorno S., Maduli E et al. Gender and liver fibrosis in chronic hepatitis: the role of iron status. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005 21(12): 1445-51.
9. Saint N. Structural and functional analysis of the HCV p7 protein. *Methods Mol Biol.* 2009;510:125-43.
10. Tedbury PR, Harris M. Characterisation of the role of zinc in the hepatitis C virus NS2/3 protease activities. *J Mol Biol.* 2007 Mar 9;366(5):1652-60. Epub 2006 Dec 28
11. Андреева-Ковалевская Ж.И. и др. Пороформирующие белки и адаптация организмов к условиям окружающей среды. *Успехи биологической химии*, т. 48, 2008, с. 267–318
12. Бакулин И.Г. и др. Результаты оценки элементного статуса у больных хроническим гепатитом C, устойчивых к противовирусной терапии. *Микроэлементы в медицине*, 2006, 7(2): 53-56
13. Кирилюк В.П. Микроэлементы в компонентах биосферы Молдовы. Кишинев, 2006
14. Тома С.И. Микроэлементы в полеводстве Молдавии. Кишинев, 1973