

6. The interrelation between chronic hepatitis C, steatosis with fibrosis and primary liver cancer was reported.

#### References

1. Adinalfi LE, Andreana A, Tripodi MF, et al. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotypes and visceral obesity. *Hepatology*. 2001;33:1358-64.
2. Rubbia Asselah T, Brandt L, Marcellin P, et al. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matters. *Gut*. 2006;55:123-130.
3. Kitase A, Hino K, Furutani T, et al. In situ detection of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids in chronic hepatitis C: correlation with hepatic steatosis. *J. Gastroenterol.* 2005;40:617-624.
4. Lippincott Williams and Wilkins. Recent advances in non-alcoholic fatty liver disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2010;26(31):202-208.
5. Mirandola Silvia, Bowman David, Hussain Mahmud M, et al. Hepatic steatosis in hepatitis C is a storage disease due to HCV interaction with microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Nutrition & Metabolism*. 2010;7:13.
6. Negro F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2006;12:6756-65.
7. Seeff LB. The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). *Liver International*. 2009;29(s1):89-99.
8. Serfaty L, Andreany T, Giral P, et al. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2001;34:428-34.
9. Valenti L, Palixi E, Fracanzani AL, et al. TNF- $\alpha$  genotype affects TNF- $\alpha$  release, insulin sensitivity and the severity of liver disease in HCV chronic hepatitis. *J. Hepatol.* 2005;43:944-50.
10. Yamaguchi A, Tazuma S, Nishioka T, et al. Hepatitis C virus core protein manipulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig. Dis. Sci.* 2005;50:1361-71.

Corresponding author

**Lupasco Iulianna, MD., Ph.D., Associate Professor**

Laboratory of Gastroenterology

Department of Internal Medicine

Nicolae Testemitanu State Medical and Pharmaceutical University

29, N. Testemitanu Street

Chisinau, Republic of Moldova

Telephone: 205539

E-mail: flowercat\_2004@yahoo.com

Manuscript received November 25, 2010; manuscript revised

January 26, 2011

## Интенсивность перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы при вирусном гепатите В

М. А. Абдурахманова, А. М. Эфендиев

Кафедра биохимии, Азербайджанский медицинский университет, Баку

**M. A. Abdurahmanova, A. M. Efendiev**

### Intensivity of Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Hepatitis B

We investigated 59 patients (41 men and 18 women). The control group included 20 healthy donors. The next biochemical indices were determined: common protein, alaninaminotrasferase, spartatamintransferase, alkaline phosphatase, lactatdehydrogenase. It was determined that the most essential changes happened in the liver indices that lead to the cytolysis of hepatocytes. The intensity of lipid peroxidation by malonic aldehydt, diene conjugates, superoxidismutase, catalase, ceruloplasmin were also studied. Results demonstrate that because of intensification of lipid peroxidation the antioxidation status of the body is changed.

**Key words:** hepatitis B viral, lipid peroxidation, antioxidants, superoxidismutase, catalase, ceruloplasmin.

#### Реферат

Проведено исследование основных биохимических показателей при гепатите В. Была исследована кровь 59 больных (41 мужчина и 18 женщин). Контрольную группу составили 20 здоровых доноров. Из биохимических показателей были определены: общий белок, аланинаминотрансфераза, аспартатамиотрансфераза, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа. Было выявлено, что значительные изменения происходят в печеночных показателях, что указывает на наличие цитолиза гепатоцитов. Также были изучены интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояние антиоксидантной системы по таким показателям, как малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, супероксиддисмутаза, каталаза, церулоплазмин. Полученные данные показали, что на фоне усиления ПОЛ происходит изменение антиоксидантного статуса организма.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит В, перекисное окисление липидов, антиоксиданты, малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, каталаза, церулоплазмин.

#### Введение

Вирусные гепатиты относятся к наиболее социально-значимым проблемам медицины и всего человечества в целом, так как характеризуются непрерывным ростом

заболеваемости и частым формированием неблагоприятных исходов (хронический гепатит, цирроз, карцинома и другие хронические процессы в организме) и смертностью, связанной как с острыми, так и хроническими формами болезни [1, 2, 3].

Наибольшую актуальность представляют вирусные гепатиты В (HVB) и С (HVC), учитывая их гематоконтактный и половой пути передачи.

Вирусным гепатитом В ежегодно в мире заболевает более четверти миллиона человек, около 300 миллионов инфицировано. По данным ВОЗ, более 1/3 населения мира уже были инфицированы гепатитом В, и сейчас 5% из них являются носителями инфекции. Носители HBV от 12 до 30 раз чаще заболевают первичным раком печени, чем остальное население. Ежегодно от патологии вызванной HBV-инфекцией умирает 2 миллиона человек [4].

Вирус гепатита В вызывает иммуноопосредованное повреждение печени, оказывает прямое гепатотоксическое действие, а также провоцирует оксидативный стресс, усиливая тем самым процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Необходимо отметить, что печень примерно на 80% состоит из мембран. Ее потенциал определяется, прежде всего, нормальным функционированием мембран. Прямое и опосредованное воздействие вируса на митохондриальные и цитоплазматические мембраны гепатоцитов сопровождается нарушением, как внутриклеточного метаболизма, так и структуры с образованием разрывов в мембране и может привести к гибели клетки [13]. Сопряженное с изменением вязкости повреждение липидного бислоя мембран является этапом некротического механизма гибели клеток и, как правило, связано с активацией ПОЛ. Известно, что пероксидному окислению подвергаются, в первую очередь, фосфолипиды, содержащие в своем составе значительно больше ненасыщенных жирных кислот, чем нейтральные липиды. Снижение содержания преимущественно легкоокисляемых фосфолипидов при патологии печени обусловлено расходом их в реакциях ПОЛ и их гидролизом под действием фосфолипазы. Пероксидный и фосфолипазный механизмы повреждения липидов тесно взаимосвязаны, совместно приводя к нарушению целостности липидного бислоя мембраны и активации процессов свободнорадикального окисления [5].

Для защиты клеток от повреждающего действия ПОЛ в организме существует сбалансированная антиоксидантная система (АОС), обезвреживающая свободные радикалы, образующиеся в процессе обмена веществ в норме и в патологии.

Несмотря на обилие научных публикаций по эпидемиологии, патогенезу, клинике, терапии и исходов вирусного гепатита В многие стороны проблемы остаются нерешенными. Например, очень мало работ посвящено изучению состояния ПОЛ и АОС у больных с вирусным гепатитом В и их зависимость от тяжести некробиотических процессов в печени.

**Целью** настоящей работы является изучение интенсивности ПОЛ и состояния АОС при вирусном гепатите В в зависимости от выраженности цитолитических процессов в печени.

#### Материал и методы

Была исследована кровь 59 больных. Распределение по полу в изучаемых группах было следующим: 18 жен-

щин и 41 мужчина; в контрольной группе 10 женщин, 10 мужчин. Средний возраст обследованных пациентов составил  $33,5 \pm 2,25$  лет, группы сравнения  $31,8 \pm 1,5$  лет. Предварительные диагнозы были следующими: хронический вирусный гепатит В – 38, острый вирусный гепатит В – 5, носитель HbsAg – 9, хронический вирусный гепатит В+С – 5, хронический гепатит неуточненной этиологии – 2.

Диагноз вирусный гепатит уточнялся данными клинического обследования и результатами ультразвукового и лабораторного исследований в соответствии с критериями и рекомендациями Международного конгресса гастроэнтерологов (Лос-Анжелес, 1994). В исследования включались пациенты с хроническим вирусным гепатитом легкой и средней степени тяжести. Длительность заболевания не превышала 3-5 лет. Объектом исследования была сыворотка крови и эритроцитарная масса. Кровь брали утром натощак из локтевой вены. В качестве антикоагулянта использовали 5% раствор ЭДТА. Полученную в результате центрифугирования плазму отделяли и собирали в пробирки для проведения исследований, а эритроциты трижды отмывали холодным физиологическим раствором и затем гемолизировали дистиллированной водой.

Биохимические показатели в сыворотке крови исследовали на автоматическом биохимическом анализаторе с помощью коммерческих наборов реактивов фирмы «Human» и «Diasis» (Германия).

Концентрацию общего белка, альбумина, глюкозы, общего билирубина и мочевины определяли по конечной точке. Активность лактатдегидрогеназы,  $\gamma$ -глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы – кинетическим методом. Тимоловую пробу определяли по методу Хуэрго и Поппера с использованием реактивов фирмы «La-Chema». Определение активности аланин- и аспартатаминотрансферазы проводили по методу Райтман-Френкеля [6]. Метод основан на определении комплекса кофейного цвета, образующегося при взаимодействии 2,4-динитрофенилгидразина с оксалоацетатом в щелочной среде или с пировиноградной кислотой, который образуется в результате реакций трансаминирования. Добавив к 0,25 мл соответствующего субстратного раствора 0,05 мл сыворотки крови, инкубируют при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение часа. Затем добавляют 0,25 мл 2,4-динитрофенилгидразина и выдерживают при комнатной температуре 20 мин. После этого, добавив 2,5 мл 0,4 М/л NaOH, через 10 мин колориметрируют на ФЭК в кювете на 1 см при длине волны 500 нм против контроля. Расчет проводят по калибровочному графику.

Активность СОД в гемолизате эритроцитов определяли по методу Дубининой Е. Е. [7]. Активность каталазы – с использованием метода Королюк М. А. и соавт. [8]. Активность глутатионпероксидазы определяли по методу, предложенному Разыграевым [9], концентрацию восстановленного глутатиона в гемолизате определяли по методу Элмана [10], содержание МДА в плазме крови определяли по методу Андреева Л. У. и соавт. [11], содержание диеновых конъюгатов в плазме определяли

Таблица 1

**Биохимические показатели сыворотки крови в группе здоровых и больных вирусным гепатитом В**

Показатели	Здоровые n = 20	Больные, 1-я группа n = 36	Больные, 2-я группа n = 23
Глюкоза, ммоль/л.	5,00 ± 0,19 (100%)	4,44 ± 0,19 (89%)	4,81 ± 0,12 (96%)
Лактатдегидрогеназа, Е/л.	263.30 ± 10,40 (100%)	365.30 ± 10,06** (139%)	301,22 ± 1,22***### (114%)
Альбумин, г/л.	44,6 ± 1,17 (100%)	39,3 ± 1,24** (88%)	42,8 ± 1,12* (96%)
Аланинаминотрансфераза, Е/л.	17,18 ± 3,06 (100%)	80,72 ± 8,87* (469,8%)	35,9 ± 4,31## (209%)
Аспаратаминотрансфераза, Е/л.	23,15 ± 1,74 (100%)	63,02 ± 5,84* (272,0%)	37,3 ± 2,41*## (161%)
γ-глутамилтрансфераза, Е/л.	12,87 ± 1,88 (100%)	27,25 ± 3,84* (212%)	22,4 ± 3,21** (174%)
Щелочная фосфатаза, Е/л.	7,67 ± 0,67 (100%)	39,14 ± 1,59** (510%)	14,3 ± 0,12***## (186%)
Билирубин, мкмоль/л.	11,60 ± 3,41 (100%)	14,36 ± 1,53* (124%)	12,3 ± 1,12* (106%)
Тимоловая проба, ед.	1,23 ± 1,74 (100%)	1,77 ± 0,38* (144%)	1,72 ± 0,32** (140%)

Примечание: Достоверность различий по сравнению с показателями в контрольной группе: \* - p < 0,05, \*\* - p < 0,01, \*\*\* - p < 0,001.

по методу Гаврилова В. Б. и соавт. [12]. Содержание церулоплазмينا (ЦП) определяли модифицированным методом Ревина [6].

Маркеры вирусного гепатита В HbsAg, Anti HbsAg определяли методом иммуноферментного анализа.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью параметрического U-критерия Уилкоксона (Манна-Уитни). Результаты исследования представлены в виде средней арифметической и средней ошибки (M ± m). Значение p < 0,05 принималось как достоверное.

**Результаты и обсуждение**

В настоящее время уже очевидно, что процессам ПОЛ принадлежит существенная роль в регуляции метаболизма мембранных липидов, изменений физико-химических свойств и проницаемости биологических мембран в физиологических условиях, а также четко установлено, что процессы ПОЛ являются одними из наиболее сильных модификаторов биомембран при целом ряде патологических состояний организма. С целью изучения интенсивности процесса ПОЛ и состояния АОС при гепатите В нами были изучены такие показатели как малоновый диальдегид (МДА), диеновые конъюгаты (ДК), из компонентов антиоксидантной системы – каталаза (КТ), супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГП), церулоплазмин (ЦП) и восстановленный глутатион (Г-SH).

Прогноз тяжести течения и исхода вирусных гепатитов базируется на клинической симптоматике, динамике маркеров, а также на характере ферментемии. Из метаболических показателей нами были изучены: количество альбумина, глюкозы, мочевины, билирубина, а из ферментов исследована активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспарат- и аланинаминотрансферазы (АСТ и АЛТ), γ-глутамилтрансферазы (γ-ГТ) и щелочной фосфатазы.

Типичным критерием ухудшения состояния больного является превышение уровня аспаратаминотрансферазы (АсАТ) над уровнем аланинаминотрансферазы (АлАТ), что свидетельствует о тяжелом некролизе гепатоцитов. Однако, известно, что довольно часто при наличии маркера вирусного гепатита В HbsAg в крови активность АсАТ находится в пределах нормы, т. е. цитолиз гепатоцитов не наблюдается. Основываясь на активности АсАТ, все больные были подразделены на 2 группы: в

первую группу входили больные с повышенным уровнем АсАТ, во вторую группу больные, у которых активность АсАТ в крови находится в пределах нормы. Полученные данные приведены в таблице 1.

У больных вирусным гепатитом В (1-я группа) по отношению к группе сравнения отмечались (таб.1) достоверно более высокие концентрации общего билирубина (+ 24%, p < 0,05), значение тимоловой пробы (+ 44%, p < 0,05), активность лактатдегидрогеназы (39%, p < 0,001), аланинаминотрансферазы (370%, p < 0,05), аспаратаминотрансферазы (172%, p < 0,05). Во второй группе активность АлАТ и АсАТ находится в пределах нормы. Нормой для этих ферментов считается активность от 5 до 40 Е/л.

У больных 1-ой группы выявлено статистически достоверные более высокие показатели ЛДГ, аминотрансфераз АЛТ и АСТ, γ-ГТ, а также щелочной фосфатазы по сравнению со 2-ой группой больных (табл. 1).

Результаты исследований показывают, что при вирусном гепатите В наблюдается накопление в крови токсичных продуктов ПОЛ, что свидетельствует об активации ПОЛ в организме этих больных (таб. 2).

Таблица 2

**Содержание показателей ПОЛ при вирусном гепатите В**

Обследованные группы	МДА, нмоль/мл	ДК, Е/мл
Здоровые, n = 20	4,07 ± 0,02	0,40 ± 0,03
Больные, 1-я группа, n = 36	6,41 ± 0,04**	0,69 ± 0,02*
Больные, 2-я группа, n = 23	5,12 ± 0,12***###	0,44 ± 0,08***#

Примечание: См. таб. 1

При исследовании больных 1-й группы мы наблюдали статистически достоверное повышение уровня ДК (p < 0,001), а также увеличение концентрации МДА в плазме крови (p < 0,001). Таким образом, в крови больных вирусным гепатитом В наблюдается статистически достоверное повышение уровня первичных продуктов ПОЛ – ДК и вторичных – МДА. При этом наблюдается четкая зависимость между степенью повышения показателей ПОЛ и тяжестью заболевания.

Результаты наших исследований показывают, что при вирусном гепатите В повышение интенсивности ПОЛ сопровождается значительными изменениями состояния основных компонентов АОС (таб. 3).

Содержание компонентов АОС в крови больных вирусным гепатитом В

Обследованные группы	СОД, МЕ/мг	ГПО, мкМ/мин/г	КТ, МЕ/мг	ЦП, МГ/ДЛ	Г-SH, мкмоль/мл
Здоровые n = 20	0,94 ± 0,03 (100%)	279,4 ± 5,66 (100%)	10,2 ± 1,5 (100%)	27,85 ± 0,45 (100%)	0,55 ± 0,02 (100%)
Больные 1-я группа	1,32 ± 0,03* (140%)	190,92 ± 3,3** (68%)	16,8 ± 3,3 (165%)	14,5 ± 0,55** (52,1%)	0,39 ± 0,01** (71%)
Больные 2-я группа	1,12 ± 0,04*# (119%)	211,1 ± 4,42**# (76%)	12,4 ± 4,1* (122%)	22,71 ± 0,60****# (82%)	0,38 ± 0,11** (69%)

Примечание: См. таб. 1

У больных 1-ой группы выявлено достоверное снижение ЦП на 48%, а во 2-ой группе наблюдается менее выраженное снижение на 18%.

Как видно из таблицы 3, у больных 1-й группы было выявлено статистически достоверное увеличение активности СОД при  $p < 0,05$ , активность СОД в эритроцитах колебалась в пределах от 0,75 до 2,53 МЕ/мл и в среднем составила  $1,32 \pm 0,03$  МЕ/мг, что на 40% выше контрольных значений. Во 2-й группе активность СОД повысилась только на 19%.

При исследовании сыворотки больных 1-й группы наблюдается тенденция подъема активности КТ в эритроцитах, однако, статистически незначимая. Так, в данной группе больных активность каталазы колеблется в пределах от 1,8 до 53,4 МЕ/мг и в среднем составляет  $16,8 \pm 3,3$  МЕ/мг, что на 64,8% выше контрольных величин. Во 2-й группе наблюдается менее выраженное повышение – на 22,3%.

В противоположность каталазе наблюдается заметное снижение уровня церулоплазмينا в сыворотке крови у больных первой группы - 48%,  $p < 0,001$ . Активность ГПО, фермента, который осуществляет восстановление гидроперекисей с участием глутатиона, наиболее снижена (на 32%) у больных 1-ой группы и в меньшей степени (на 24%) у больных 2-ой группы. Аналогично происходит снижение количества восстановленного глутатиона на 29%. Уровень восстановленного глутатиона в первой и во второй группе практически равен.

Из компонентов антиоксидантной системы особый интерес представляет плазменный белок церулоплазмин. В результате функционирования церулоплазмينا предотвращается активация ПОЛ, активным участником которого выступают ионы двухвалентного железа. Для детоксикации двухвалентного железа, являющегося катализатором свободнорадикального окисления, в плазме крови существует система, представленная ферментом ЦП (феррооксидазой), который окисляет ионы железа. ЦП элиминирует супероксидные радикалы и предупреждает аутоокисление липидов в мембранах клетки. Обладая феррооксидазной активностью, ЦП находится на первой линии антиоксидантной защиты организма и отмеченное нами выраженное снижение его уровня у обследованных нами больных отрицательно сказывается на биологических функциях ЦП.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о глубоких изменениях в активности антиоксидантных компонентов. Причем, эти изме-

нения носят разнонаправленный характер. На фоне статистически достоверного подъема активности СОД наблюдается снижение активности ГПО, а также уровня церулоплазмينا и восстановленного глутатиона. Этот факт создает теоретические предпосылки для назначения препаратов с антиоксидантным действием в качестве адъювантной терапии при проведении лечения вирусного гепатита В.

С другой стороны, наличие четкой зависимости между тяжестью цитолитического процесса в печени и выраженностью биохимических сдвигов в крови позволяет использовать данные биохимические методы в диагностических и прогностических целях.

### Литература

1. Лок АСФ, МакМахон БДж. Хронический гепатит В: практические рекомендации Американской ассоциации по изучению заболеваний печени. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2007;9(4):292-311.
2. Ивашкин В, Буеверов А. Хронические заболевания печени сегодня и завтра. *Врач*. 2000;6:4-6.
3. Баженов АИ, Кноплева МВ. Оценка чувствительности коммерческих тест-систем для иммунодетекции НВsAg по их способности выявлять НbSAg-мутанты вируса гепатита В. *Журн. Микробиол.* 2008;3:48-53.
4. Мироджев ГК, Аvezов СА. Клеточный иммунитет и апоптоз гепатоцитов при хронических холестатических гепатитах. *Клиническая медицина*. 2005;10:30-33.
5. Гейвандова НИ, Ягода АВ. Сывороточные фосфолипиды, показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты как дополнительные неинвазивные маркеры активности хронического вирусного гепатита С. *Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол.* 2008;6:38-42.
6. Колб ВГ, Камышников ВС. *Клиническая биохимия*. Минск, 1976.
7. Дубинина ЕЕ, Сальникова ЛА, Ефимова ЛФ. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека. *Лаб. дело*. 1983;10:30-33.
8. Королюк МА, Иванова ЛИ. Методы определения активности каталазы. *Лаб. дело*. 1988;1:16-19.
9. Разыграев АВ. Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и дитиобис (2-нитробензойной кислоты). *Клиническая лаб. диагностика*. 2006;6:13-16.
10. Ellman AL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959;82(1):48-51.
11. Андреева ЛИ, Кожемякин ЛА. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лаб. дело*. 1988;11:41-44.
12. Гаврилова ВВ, Гаврилова АР, Хмара НФ. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. *Лаб. дело*. 1988;2:60-64.
13. Czeczot Hanna, Scihior D, Skrycki M, et al. Glutathione and G-SH- dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Acta Biochimica Polonica*. 2006;53(1):237-241.

Corresponding author

**Abdurahmanova Malahat Arif kizi, Laboratory Doctor**  
 Department of Biochemistry  
 Azerbaijan Medical University  
 98, Mardanov kardashlari Street  
 Baku, 370010, Azerbaijan  
 Telephone: 4953953  
 E-mail: gulib18@mail.ru

Manuscript received January 10, 2011; revised manuscript February 02, 2011