

Л.В. Коркоташвили, С.В. Романова, С.А. Колесов

Нижегородский НИИ детской гастроэнтерологии, Российская Федерация

Оксид азота, его метаболиты и система глутатиона у детей с хроническим вирусным гепатитом В и С

Цель исследования. Выявить изменения концентрации оксида азота и его метаболитов — нитритов и нитратов во взаимосвязи с показателями системы глутатиона у детей с хроническим гепатитом В и С. **Пациенты и методы.** В исследовании приняли участие 76 детей с хроническим гепатитом В и С в возрасте от 7 до 16 лет обоего пола. Оксид азота и его метаболиты определяли по методу В.А. Метельской и Н.Г. Гумановой; уровень восстановленного глутатиона — титриметрическим методом; активность глутатионтрансферазы — методом спектрофотометрии. **Результаты.** Содержание оксида азота и его метаболитов — нитритов и нитратов — в сыворотке крови и моче детей с хроническим вирусным гепатитом В и С повышено. Выявлены взаимосвязи между оксидом азота и его метаболитами в сыворотке крови и моче, а также между этими показателями и параметрами системы глутатиона — концентрацией восстановленного глутатиона и активностью ферментов глутатионтрансферазы эритроцитов и плазмы. **Выводы.** У детей с хроническим вирусным гепатитом В и С повышение концентрации оксида азота и его метаболитов в сыворотке крови и моче сопровождается снижением концентрации восстановленного глутатиона и повышением активности глутатионтрансферазы эритроцитов и плазмы. Полученные результаты говорят о наличии окислительного стресса, в связи с чем необходимо оптимизировать терапию с усилением антиоксидантного воздействия.

Ключевые слова: хронический гепатит, оксид азота, нитраты, нитриты, система глутатиона.
(Вестник РАМН. 2013; 10: 26–30)

26

Введение

Значимое место в структуре заболеваний гепатобилиарной системы у детей занимают хронические вирусные гепатиты В и С (ХГВ, ХГС). Достигнуты существенные успехи в диагностике, лечении и профилактике этих заболеваний у детей. Однако высокий уровень распространенности и неблагоприятные последствия обуславливают необходимость дальнейшего изучения их патогенеза с целью разработки информативных критериев прогноза и эффективности лечения данных заболеваний.

Печень вовлечена во многие патологические процессы, и ее повреждения приводят к значительным наруше-

ниям метаболических процессов. Одним из механизмов, ведущих к гибели гепатоцитов, является нитрозилирующий и оксидативный стресс. Изучение новых аспектов в патогенезе гепатитов, в частности исследование медиаторов межклеточного взаимодействия, к числу которых относится оксид азота (NO) и его метаболиты, представляет особый интерес. В печени проходит сложный цикл мочевины, в результате которого из аммиака и орнитина образуется аргинин. Именно из аргинина постоянно синтезируется оксид азота. NO продолжает образовываться даже при отсутствии аргинина в печени, т.к. в гепатоцитах содержатся эндогенные источники этой аминокислоты. В гепатоцитах оксид азота участвует

L.V. Korkotashvili, S.V. Romanova, S.A. Kolesov

Nizhny Novgorod Research Institute of Children Gastroenterology, Russian Federation

Nitric Oxide, its Metabolites, and Glutathione System in Children with Chronic Viral Hepatitis B and C

Aim. To detect changes in the concentration of nitric oxide and its metabolites — nitrites and nitrates in conjunction with the indices of the glutathione system in the children with chronic hepatitis B and C. **Patients and methods.** In the research took a part 76 patients (boys or girls) with chronic hepatitis B and C aged from 7 up to 16 years. Nitric oxide and its metabolites determined by method of V.A. Metel'skaya and N.G. Gumanova; level of reduced glutathione — the titrimetric analysis; activity of glutathione transferase — the method of spectrophotometry. **Results.** The content of nitric oxide and its metabolites— nitrites and nitrates — in serum and urine of children with chronic viral hepatitis B and C have increased. Correlations were revealed between nitric oxide and its metabolites in serum and urine, as well as between these indices and glutathione system parameters — reduced glutathione concentration and activity of enzymes of glutathione transferase of erythrocytes and plasma. **Conclusions.** In the children with chronic viral hepatitis B and C the increase of the concentration of nitric oxide and its metabolites in serum and urine is accompanied by decrease of reduced glutathione concentration and increase of glutathione transferase activity in erythrocytes and plasma. These findings suggest the presence of oxidative stress due to which the therapy should be strengthened by antioxidant effect.

Key words: chronic hepatitis, nitric oxide, nitrates, nitrites, glutathione system.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 10: 26–30)

в процессах ингибирования глюконеогенеза, белкового синтеза, синтеза цитохрома P-450, дыхания митохондрий, а также активации гуанилатциклазы; важная роль принадлежит оксиду азота и в регуляции внутрипеченочной гемодинамики.

Оксид азота является универсальным регулятором различных биохимических процессов. Его молекула имеет широкий спектр биологического действия. NO довольно неустойчив, период его полураспада колеблется от 2 до 30 с. Синтезируется оксид азота во всех органах, активно участвуя в защите организма от инфекции и регулируя все его жизненно важные функции: сосудистый тонус и проницаемость эндотелия, процессы гемостаза, клеточную пролиферацию. Известно, что оксид азота может блокировать размножение как внеклеточных, так и внутриклеточных микроорганизмов, в т.ч. репликацию вирусов. NO, синтезируемый купферовскими клетками, подавляет синтез белков в неизмененных гепатоцитах. Цитотоксическое действие оксида азота может приводить к благоприятным и неблагоприятным последствиям для организма. Ранее роль NO связывали только с воспалением, однако, как стало известно позднее, он участвует во множестве физиологических и патофизиологических реакций организма [1], в т.ч. в процессах апоптоза [2].

Существенное значение оксид азота и его метаболиты имеют и для различных отделов системы пищеварения [3]. Так, установлено, что у лиц с заболеваниями верхнего отдела пищеварительного тракта имеет место положительная корреляция между содержанием оксида азота и объемом базальной и стимулированной желудочной секреции, т.е. NO является причиной дилатации и стимуляции желудочной секреции [4]. Динамика содержания оксида азота и его метаболитов изучена при хронических болезнях верхних отделов пищеварительного тракта. У взрослых пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью происходит увеличение продукции оксида азота и его метаболитов. У детей с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки установлено увеличение содержания метаболитов NO [5]. Обнаружено значительное повышение продукции оксида азота у детей с хроническим гастродуоденитом, холецистохолангитом и дисфункцией билиарного тракта. При хроническом неязвенном колите отмечено снижение концентрации NO, причем оно сочетается с интенсификацией перекисных процессов, снижением активности каталазы, что свидетельствует об инактивации NO вследствие повышенного образования активных форм кислорода. У больных язвенным колитом пул оксида азота существенно увеличен [6]. Содержание оксида азота повышено у детей с болезнью Крона и неспецифическим язвенным колитом [7]. Определение уровня оксида азота исследователи предлагают использовать в качестве дополнительного критерия обострения хронического панкреатита [8].

Оксид азота также оказывает выраженное влияние на печень. Установлено, что у больных стеатогепатитом на фоне метаболического синдрома он является маркером воспалительной реакции и может служить дополнительным критерием оценки степени воспаления и прогнозирования течения данного заболевания [9]. Уровень оксида азота при хроническом гепатите и циррозе печени был сопряжен с выраженностью цитолитического синдрома [10]. При циррозе печени увеличивается продукция NO в сыворотке крови и моче [11]. Принято считать, что определение содержания оксида азота является информативным тестом для дифференциальной диагностики минимального и умеренного фиброза печени при хро-

ническом гепатите и выраженном фиброзе у пациентов с циррозом печени [12].

При хроническом гепатите нарушение детоксикационной функции печени приводит к развитию эндогенной интоксикации. Установлена тесная положительная корреляция между концентрацией нитритов, нитратов и эндотоксинов в сыворотке крови взрослых, больных циррозом печени. Как известно, оксид азота может оказывать как защитное, так и повреждающее действие. Он играет немаловажную роль в процессах, регулирующих продукцию свободных радикалов. Сама его молекула как одна из реактивных форм кислорода участвует в инициации оксидативного стресса, обладая самостоятельными антиоксидантными свойствами. Оксид азота способен активировать продукцию глутатиона. Роль NO, его метаболитов, а также участие системы глутатиона в патогенезе хронических вирусных гепатитов В и С представляют большой интерес в связи с выявлением новых особенностей этих заболеваний у детей.

Цель исследования: выявить изменения концентрации оксида азота и его метаболитов — нитритов (NO_2^-) и нитратов (NO_3^-) — во взаимосвязи с показателями системы глутатиона у детей с ХГВ и ХГС.

Пациенты и методы

27

Участники исследования

Объектом исследования были дети с хроническим вирусным гепатитом В и С в возрасте от 7 до 16 лет. Группу детей с хроническим гепатитом В составили 30 человек, из них 14 мальчиков в возрасте 8–14 лет и 16 девочек в возрасте 7–16 лет. Группу детей с хроническим гепатитом С составили 46 человек, из них 24 мальчика в возрасте 7–15 лет и 22 девочки в возрасте 8–16 лет. Юридическим основанием для взятия крови являлось одобрение исследований Этическим комитетом и наличие информированного добровольного согласия родителей (или самих детей в возрасте старше 14 лет) на участие их детей в проведении исследований.

Методы исследования

Кровь для выполнения лабораторных тестов получали утром, натощак, путем венепункции локтевой вены. Получение сывороток осуществлялось стандартным методом.

Концентрации стабильных метаболитов оксида азота в сыворотке крови определяли по методу В.А. Метельской и Н.Г. Гумановой [13], при этом нитраты восстанавливали до нитритов при помощи хлорида ванадия (III), а нитриты детектировали в реакции Грисса. Определение уровня восстановленного глутатиона осуществляли по титриметрическому методу Вудворта—Фрея [14], активность глутатионтрансферазы в эритроцитах и плазме — спектрофотометрически [15].

Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica v. 6.0 (Statsoft Inc., США). Применяли общепринятые методы параметрической и непараметрической статистики. Определяли ряд параметров описательной статистики (медиана, средняя величина). Поскольку распределение величин во всех анализируемых группах отличалось от нормального, достоверность различий между исследуемыми группами оценивали при помощи *U*-критерия Манна—Уитни. Для опреде-

ления взаимосвязи между изучаемыми показателями рассчитывали коэффициент корреляции (тест Спирмена). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты исследований содержания оксида азота и его метаболитов представлены в табл. 1. Установлено, что при ХГВ и ХГС у детей концентрация оксида азота и его метаболитов (нитритов и нитратов) в сыворотке крови достоверно повышается. Содержание NO в сыворотке крови у детей с ХГВ и ХГС повышено в 1,7 и 1,8 раза, соответственно. Концентрация метаболитов также увеличивается: нитритов при ХГВ — в 1,6, при ХГС — в 1,8 раза. Существенной разницы между показателями NO в зависимости от этиологии заболевания не установлено. Отмечена лишь слабая тенденция к повышению их концентрации у детей с гепатитом С. Медиана данного показателя увеличивалась у детей с патологией и была равна 35 у больных ХГВ, 45 — у детей с ХГС, у здоровых обследуемых она составила 26. Такая же тенденция сохранялась и при исследовании содержания нитритов и нитратов в сыворотке крови.

В моче у больных концентрация оксида азота и его метаболитов, как и в крови, оказалась повышенной: при ХГВ — в 1,3, при ХГС — в 1,2 раза. Медиана оксида азота в моче здоровых детей составила 1188, у детей с ХГВ — 1532, у детей с ХГС — 1246. Нитриты мочи у детей с ХГВ увеличены по сравнению с контрольной группой почти в 3, у детей с ХГС — в 3,5 раза. Содержание нитратов в моче тоже было повышено: при ХГВ — в 1,3, при ХГС — в 1,2 раза.

Механизмы взаимодействия вирусов гепатита В и С с организмом различны, что и подтверждают приведенные данные. Однако и при том и при другом заболевании получены результаты, которые подтверждают интенсивную выработку оксида азота и его метаболитов. С одной стороны, это можно расценивать как его роль в защите гепатоцитов от повреждающего действия токсических веществ, с другой стороны — это ведет к изменению важных путей метаболических реакций, вызывая нарушение цикла Кребса, снижение интенсивности синтеза аденозинтрифосфата, что может привести к усилению апоптоза

клеток печени. По повышенной концентрации оксида азота и его метаболитов в крови и моче можно судить о возникновении нитрозилирующего стресса при данной воспалительной патологии.

При изучении корреляций между оксидом азота и его метаболитами в сыворотке крови и моче у детей с ХГВ была установлена тесная прямая взаимосвязь между оксидом азота и его метаболитами в крови и моче. Однако достоверная корреляция наблюдалась только между нитритами крови и мочи ($r = 0,60$; $p = 0,05$). У детей с ХГС такой взаимосвязи обнаружено не было.

Известно, что патологические эффекты NO реализуются не только за счет нитрозилирующего, но и оксидативного стресса, в ходе которых оксид азота становится цитотоксической молекулой и теряет свои полезные физиологические свойства. Защиту тканей, органов, систем организма от оксидативного стресса осуществляют эндогенные антиоксиданты, в первую очередь система глутатиона. Сам глутатион является одним из главных протекторов при окислительном стрессе, поскольку представляет собой мощный антиоксидант. Наличие активной сульфгидрильной группы определяет участие глутатиона в многочисленных метаболических реакциях, обеспечивающих нормальное течение различных физиологических и биохимических процессов. Он поддерживает функциональную активность мембран, участвует в метаболизме лейкотриенов и простагландинов, влияет на биосинтез нуклеиновых кислот и белка, имеет значение для пролиферации клеток, но его важнейшая функция состоит в участии в метаболизме ксенобиотиков. Глутатион является центральным звеном в антиперекисной и антирадикальной защите клетки.

В редокс-систему глутатиона входит фермент глутатион-трансфераза (ГТ), которая осуществляет конъюгацию глутатиона с различными субстратами: лейкотриеном A_4 , простагландином A_1 , витамином K_3 , эстрадиолом. ГТ является также маркером окислительного стресса. Известно, что активность ГТ наиболее высока в ткани печени. Из нее конъюгаты выделяются в желчь и затем выводятся из желудочно-кишечного тракта. ГТ также выполняет функции антиоксиданта. Несмотря на то, что основной механизм детоксицирующего действия ГТ — это конъюгация ксенобиотиков с глутатионом под ее контролем, существуют и другие механизмы детоксикации с участием данного фермента.

Таблица 1. Содержание оксида азота и его метаболитов в крови и моче у детей с хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ) и С (ХГС)

	Здоровые	ХГВ	ХГС
NO крови, мкМ/л	27,11±1,71 $n = 42$	45,49±5,66 $n = 24$ $p = 0,001$	47,87±3,01 $n = 46$ $p = 0,001$
NO ₂ ⁻ крови, мкМ/л	9,08±0,46 $n = 42$	14,41±1,02 $n = 24$ $p = 0,001$	16,07±0,95 $n = 46$ $p = 0,001$
NO ₃ ⁻ крови, мкМ/л	18,03±1,57 $n = 42$	31,08±5,79 $n = 24$	31,8±3,01 $n = 46$
NO мочи, мкМ/л	1225,46±201,31 $n = 21$	1606,09±288,58 $n = 24$	1520,46±179,79 $n = 29$
NO ₂ ⁻ мочи, мкМ/л	1,14±0,36 $n = 21$	3,39±1,14 $n = 24$	4,02±0,58 $n = 29$ $p = 0,001$
NO ₃ ⁻ мочи, мкМ/л	1224,46±201,23 $n = 21$	1602,7±288,55 $n = 24$	1516,0±179,5 $n = 29$

Примечание (здесь и в табл. 2). n — число обследованных, p — достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми.

Таблица 2. Содержание показателей системы глутатиона в крови у детей с хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ) и С (ХГС)

	Здоровые	ХГВ	ХГС
Глутатион восстановленный, мкМ/л	1303,87±30,77 n=26	1159,97±34,76 n=24 p=0,001	1153,34±22,59 n=40 p=0,001
Глутатионтрансфераза эритроцитов, мкМ/мин × г Нб	1,32±0,12 n=20	1,63±0,17 n=30	1,94±0,19 n=40
Глутатионтрансфераза плазмы, мкМ/мин	2,42±0,33 n=20	5,01±0,53 n=30 p=0,001	4,15±0,38 n=40

Результаты исследования содержания глутатиона, а также активности ферментов глутатионовой системы — ГТ в эритроцитах и плазме крови детей с ХГВ и ХГС представлены в табл. 2.

Концентрация восстановленного глутатиона у этих детей достоверно снижена, что свидетельствует об усилении распада и подавлении его синтеза. Снижение интенсивности образования глутатиона повышает возможность дальнейшего усугубления оксидативного стресса и развития воспалительных реакций. Активность ГТ в эритроцитах и плазме крови повышена по сравнению с контрольными значениями, причем в плазме — существенно. Это говорит о снижении детоксикационной функции печени и нарушении работы антиоксидантной системы организма.

При анализе корреляций обнаружили, что у детей с ХГВ снижение содержания глутатиона сопровождается увеличением концентрации оксида азота ($r = -0,43$; $p < 0,05$) и нитратов ($r = -0,45$; $p < 0,05$) в сыворотке крови. У детей с ХГС наблюдалась та же тенденция, но выраженной корреляции между содержанием глутатиона и оксида азота и его метаболитов установлено не было.

При анализе взаимосвязи между ГТ в эритроцитах и плазме крови с концентрацией NO и его метаболитов у детей с ХГВ не выявлено существенных зависимостей. Однако установлено, что при повышении содержания оксида азота и его метаболитов в сыворотке крови и моче активность ГТ плазмы возрастает, т.е. при нарушении детоксицирующей функции печени имеет место повышение уровня NO, NO₂⁻, NO₃⁻. Напротив, у детей с ХГС тесная прямая взаимосвязь установлена между активностью ГТ плазмы и содержанием NO, NO₂⁻, NO₃⁻ ($r = 0,41$, $p < 0,05$; $r = 0,35$, $p < 0,05$; $r = 0,32$, $p < 0,05$, соответственно). Кроме того, между ГТ плазмы

и NO и NO₃⁻ мочи обнаружена обратная взаимосвязь ($r = -0,43$, $p < 0,05$; $r = -0,42$, $p < 0,05$).

Заключение

Установлено, что у детей с ХГВ и ХГС содержание оксида азота и его метаболитов в сыворотке крови и моче повышено, что сопровождается снижением концентрации восстановленного глутатиона и повышением активности фермента ГТ эритроцитов и плазмы крови.

Увеличение концентрации окиси азота и усиление оксидативного стресса приводит к образованию пероксинитратов и в конце концов к разобщению процессов окислительного фосфорилирования, повреждению ДНК и сопутствующему циклу изменений в виде воспаления. И воспалительная реакция, и оксидативный стресс будут оказывать разрушающее действие как на систему детоксикации в частности, на пищеварительную систему, так и на все основные системы организма. В условиях оксидативного стресса может активизироваться процесс образования фиброзной ткани, что приводит к формированию цирроза печени у больных ХГВ и ХГС. Именно поэтому одним из средств патогенетической терапии при гепатитах является назначение препаратов, улучшающих антиоксидантную защиту организма.

Безусловно, необходимо дальнейшее изучение эффектов окиси азота и его метаболитов (в т.ч. и в тканях) для более глубокого понимания участия этой уникальной молекулы в патогенезе стремительно нарастающих заболеваний печени у детей, что, возможно, позволит сформулировать критерии степени тяжести заболевания и прогноза его течения, оптимизировать терапию путем усиления антиоксидантного воздействия.

REFERENCES

- Smirnov V.V., Gorbunov G.E. *Pediatrics* - *Pediatrics*. 2010; 6(89); app. 1): 182–188.
- Ckless K., Van der Vliet A., Janssen-Heininger Y. Arginase modulates NF-κB activity via a nitric oxide-dependent mechanism. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007; 36: 645–653.
- Lundberg Y.J., Weitzberg E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut*. 2013; 62 (4): 616–629.
- Magomedminova A.S., Esedov E.M. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika – Clinical Laboratory Diagnostics*. 2010; 7: 48–50.
- Vidmanova T.A., Shabunina E.I., Zhukova E.A., Kulik N.N. *Rossiiskii pediatricheskii zhurnal – The Russian Journal of Pediatrics*. 2004; 1: 45.
- Goggins M.G., Shah S.A., Goh J. Increased urinary nitrite, a marker of nitric oxide, in active inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm.* 2001; 10: 69–73.
- Kolesov S.A., *Vrach-aspirant – Postgraduate Doctor*. 2012; 3 (52): 471–479.
- Vinokurova L.V., Berezina O.I., Drozdov V.N., Petrakov A.V., Nilova T.V. *Lechashhii vrach - Practicing Doctor*. 2011; 2: 39–43.
- Zvenigorodskaya L.A., Nilova T.V. *RMZh – Russian Medical Journal*. 2008; 2(10): 47–49.
- Zafirova V.B. *Klinicheskoe i patogeneticheskoe znachenie narushenii mikrotsirkulyatsii i sostoyaniya endotelial'nykh mediatorov pri khronicheskikh virusnykh zabolovaniyakh pecheni. Avtoref. dis. kand. med. nauk* [Clinical and Pathogenetic Sense of Microcirculation Disorders and Endothelial Mediators State in Chronic Liver Viral Diseases. Author's abstract]. Pyatigorsk, 2011. 16 p.
- Montoliu C., Kosenko E., Del Olmo J.A. Correlation of nitric oxide and atrial natriuretic peptide changes with altered cGNP homeostasis in liver cirrhosis. *Liver Int.* 2005; 25 (4): 787–795.
- Shchekotova A.P., Bulatova I.A., Mugatarov I.N. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy – International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2012; 3: 39–41.

13. Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika – Clinical Laboratory Diagnostic*. 2005; 6: 15–18.
14. Sokolova L.Ya. *Diagnostika i biokorreksiya narushenii antiinfektsionnogo gomeostaza v sisteme «mat'–ditya»*. *Kniga dlya prakticheskogo vracha*. [The Diagnostics and Biocorrection of Anti-Infective Homeostasis Disorders in the mother-child system. The Book for Practicing Doctor]. Nizhny Novgorod, NizhGMA, 2004. 376 p.
15. Habig W.H., Pabst M.G., Gacoby M.B. Glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 7130.

FOR CORRESPONDENCE

Korkotashvili Lyubov' Vasil'evna, MD, Head of the laboratory diagnostic department of FSBI “Nizhny Novgorod Research Institute of Pediatric Gastroenterology” of the Ministry of Health of Russian Federation.

Address: 22, Semashko St., Nizhny Novgorod, 603950, **tel.:** (831) 436-54-60, **e-mail:** lvkor@inbox.ru

Romanova Svetlana Vladimirovna, MD, leading research scientist of the upper alimentary tract pathology clinic of FSBI “Nizhny Novgorod Research Institute of Pediatric Gastroenterology” of the Ministry of Health of Russian Federation.

Address: 22, Semashko St., Nizhny Novgorod, 603950, **tel.:** (831) 436-15-90, **e-mail:** niidg@mail.ru

Kolesov Sergei Alekseevich, MD, senior research scientist of the laboratory diagnostic department of FSBI “Nizhny Novgorod Research Institute of Pediatric Gastroenterology” of the Ministry of Health of Russian Federation.

Address: 22, Semashko St., Nizhny Novgorod, 603950, **tel.:** (831) 436-54-60, **e-mail:** niidg@mail.ru