

УДК 616.36–002.2–06:616.36–002.17–074

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.63–70

Оксидативное и нитрозативное повреждение ДНК в патогенезе фиброза печени при хронических вирусных гепатитах

А.О. Михайлов¹, А.Ф. Попов², В.А. Иванис², Е.В. Хамуева¹, Н.С. Иванова², А.И. Симакова²¹ Краевая клиническая больница № 2 (690105, г. Владивосток, ул. Русская, 55),² Тихоокеанский государственный медицинский университет (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

В сыворотке крови 150 пациентов с хроническими вирусными гепатитами (ХВГ) В и С и в сыворотке крови и в гомогенатах печени, взятых после 31 аутопсии лиц, погибших от цирроза печени в исходе ХВГ, исследовали общую антиоксидантную активность, содержание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, 8-нитрогуанина, восстановленного глутатиона, малонового диальдегида и 4-гидрокси-2,3-ноненаля. Также методом комет анализировали степень деструкции ДНК в лимфоцитах периферической крови и гепатоцитах. Установлено, что деструкция ДНК гепатоцитов и лимфоцитов периферической крови – один из ведущих компонентов формирования фиброза печени при ХВГ В и С и может рассматриваться, как его патогномоничный маркер. Выявлена прямая связь поврежденный ДНК с выраженностью склеротических изменений в печени. Оксидативный и нитрозативный стресс вызывал в гепатоцитах и лимфоцитах значимые нарушения целостности мембранных органелл. Биохимические изменения в ткани печени при ХВГ В и С в целом сопоставимы с таковыми в сыворотке крови по всем показателям, что делает их перспективными в плане разработки алгоритмов диагностики фиброза печени.

Ключевые слова: метод ДНК-комет, оксидативный и нитрозативный стресс, гепатоциты, лимфоциты

Несмотря на большое количество исследований, посвященных вирусным гепатитам, многие вопросы их патогенеза до сих пор остаются нерешенными. В первую очередь это относится к патогенным свойствам самих вирусов, характеру и закономерностям реагирования организма-хозяина на антиген, формированию цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы и ряду других аспектов [4, 10]. С другой стороны, важна и оценка непосредственной генотоксичности вирусов гепатитов В и С [8]. В этом направлении разрабатываются теории, связанные с апоптозом гепатоцитов, считающимся ключевым моментом в патогенезе вирусного поражения печени. Однако работ, в которых оценивались бы количественные характеристики деструкции ДНК при вирусных гепатитах, не так уж много. Есть противоречивые данные о состоянии ДНК лимфоцитов периферической крови при хроническом вирусном гепатите (ХВГ). Одни авторы указывают здесь на наличие значимых изменений, другие эти данные не подтверждают [4, 7, 9]. К настоящему времени до конца не определена зависимость между степенью деструкции ДНК гепатоцитов и лимфоцитов в разных группах пациентов, страдающих вирусными гепатитами с циррозом печени и без него [5]. Существуют разногласия и в вопросах выделения ведущих факторов неблагоприятного прогноза заболевания. До сих пор неясным остается вклад повреждений ДНК в последующую регенерацию и пролиферацию гепатоцитов [10]. Еще более актуальными проблемами можно назвать выделение маркеров, способных предсказать переход цирроза печени в гепатоцеллюлярный рак, а также поиск путей предотвращения этой трансформации [8].

Михайлов Александр Олегович – врач-гастроэнтеролог ККБ № 2; e-mail: mao1991@mail.ru

Материал и методы

Настоящее исследование выполнено с 2012 по 2018 гг. и включало 150 пациентов 18–82 лет (в среднем – 40,1 года), страдавших ХВГ С и ХВГ В и находившихся на стационарном лечении в инфекционном отделении Краевой клинической больницы № 2 и отделении вирусных гепатитов Краевой клинической инфекционной больницы. Степень выраженности фиброза печени оценивалась по данным эластометрии. Все исследуемые по выраженности фиброза (категория F шкалы METAVIR) были условно разделены на шесть групп: ХВГ В (F0), ХВГ В (F1–2), ХВГ В (F3–4), ХВГ С (F0), ХВГ С (F1–2), ХВГ С (F3–4). Контрольную группу сформировали 43 добровольца без сопутствующих аутоиммунных, острых и хронических заболеваний.

Также были проанализированы истории болезни и материалы аутопсий 31 случая ХВГ С и В за 2012–2018 гг. Критериями включения в исследование здесь было наступление смерти от осложнений основного заболевания или от ургентных состояний. Возраст умерших колебался от 25 до 72 лет (средний возраст – 54,1 года). В контрольную группу для этого контингента наблюдений были взяты материалы судебно-медицинских аутопсий 16 человек без инфекционных заболеваний, сопоставимых по полу и возрасту, и погибших от черепно-мозговых травм. Субстратом для анализа служили образцы периферической крови, полученные от живых и умерших пациентов, а также ткань печени, взятая на аутопсии.

Оценку степени повреждения ДНК проводили методом ДНК-комет в щелочной среде [6, 15]. Для этого 50 мкл исследуемых образцов (отмытые лимфоциты, взвесь клеток печени) смешивали с 500 мкл 1 % раствора легкоплавкой агарозы (Sigma), приготовленной

на фосфатно-солевом буфере при температуре 37 °С, до финальной концентрации 104 клеток/мл. Затем 60 мкл клеточной суспензии наносили на срезы, предварительно покрытые нормоплавкой агарозой (Sigma), и накрывали покровными стеклами. Срезы для застывания агарозы хранили 5 мин. при температуре 4 °С. После затвердевания покровные стекла снимали, и препараты помещали в холодный (4 °С) лизирующий буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 10, 2,5 мМ NaCl, 100 мМ EDTA-Na₂, 1 % Triton X-100, 10 % ДМСО) на час при 4 °С. По окончании лизиса препараты переносили в камеру для электрофореза, содержащую щелочной буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂) на 40 мин. Далее проводили электрофорез при напряжении 20 В и силе тока 300 мА в течение 25 мин. Срезы после электрофореза обрабатывали трижды по 5 мин. нейтральным буфером (0,4 М Tris-HCl, pH 7,5), затем дегидратировали метанолом и красили раствором бромида этидия (2 мкг/мл). Препараты ДНК просматривали на флуоресцентном микроскопе при увеличении в 200 крат. Полученные изображения анализировали с помощью программы CometScore. Просматривали не менее 100 клеток в каждом препарате.

Описанная модификация метода позволяла оценить количество одно- и двунитевых разрывов ДНК в ядродержащих клетках. При ее использовании представлялось возможным классифицировать и визуально подсчитать клетки, погибшие путем апоптоза и некроза. Для оценки степени повреждения ДНК применяли показатель содержания ДНК в хвосте комет. Также регистрировали количество комет с повреждениями ДНК более 50 %, известные в литературе под названием «апоптотические ДНК-кометы». Признаком некроза считали широкие рыхло-диффузные ДНК-кометы неправильной формы.

Определение уровней 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и 8-нитрогуанина осуществляли на образцах сыворотки и гомогенатах с помощью наборов для иммуноферментного анализа: Highly Sensitive 8-OHdG Check ELISA (Fukuroi, Shizuoka, Japan) и Nitrosative DNA/RNA Damage ELISA Kit, 8-Nitroguanine Quantitation (Cell Biolabs, Inc.).

Для анализа общей антиоксидантной активности (ОАА) в предварительно нагретую и заполненную 0,1 М фосфатным буфером (pH 7, 37 °С) кварцевую кювету вносили 90 мкл раствора, содержащего 5 ммоль 2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоната, и 10 мкл исследуемого образца (сыворотка, гомогенат). После этого в кювету быстро добавляли 300 мкл раствора, содержащего 200 ммоль 2,2'-азо-бис(2-амидинпропана) и, быстро встряхнув содержимое, ставили кювету в спектрофотометр (Shimadzu AA-6800) с термостатом (37 °С). Измеряли время, в течение которого оптическая плотность оставалась в пределах ± 10 (lag-time) в режиме абсорбции при длине волны 414 нм. Результаты пересчитывали на единицы ОАА, идентичные параметрам для тролокса (в ммоль/л).

Концентрацию восстановленного глутатиона измеряли в образцах (сыворотка, гомогенат) на спектрофотометре Shimadzu UV-1650PC по методу Sedlak and Lindsay, в котором реактив Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) реагирует с сульфгидрильными группами цистеина, образуя 2-нитро-5-меркаптобензойную кислоту с максимальной адсорбцией при 412 нм.

Индекс пероксидного окисления липидов оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) и 4-гидрокси-2,3-ноненаля. Для этого 200 мкл образца (сыворотка, гомогенат) смешивали с 650 мкл раствора метанола-ацетонитрила (в соотношении 1:3), содержащего хромогенный агент N-метил-2-фенилиндол, и встряхивали. После добавления 150 мкмоль 15,4 М метансульфонової кислоты инкубировали 40 мин. при температуре 45 °С. Реакция между комплексом «малоновый диальдегид + 4-гидрокси-2,3-ноненаль» и N-метил-2-фенилиндром давала стабильный хромофор, который подвергали спектрофотометрически в режиме абсорбции при длине волны 586 нм, используя 10 ммоль раствор 4-гидрокси-2,3-ноненаля в качестве стандарта. Концентрация 4-гидрокси-2,3-ноненаля равнялась разнице между общим комплексом продуктов перекисного окисления липидов и малоновым диальдегидом. Содержание белка в образцах определяли по методу Лоури.

Морфологическая оценка степени фиброза печени у умерших проводилась по стандартным методикам, принятым в патологической анатомии. Из заключенных в парафиновые блоки образцов готовили срезы толщиной 3–4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии. Для оценки степени фиброза применялась окраска по ван Гизону. Для определения активности воспалительного процесса и выраженности фиброза печени использовалась полуколичественная шкала METAVIR.

По всем показателям крови, а также возрасту и полу пациентов были рассчитаны описательные статистические характеристики, в т.ч. средние арифметические (M) и их стандартные отклонения (s). Для тестирования статистической значимости различий между средними всех количественных показателей использовали тест Манна-Уитни для каждой пары групп, и полученные уровни значимости корректировали на множественность сравнений с помощью метода Холма. Также было проведено сравнение средних значений показателей крови и печени по следующим индикаторам: ОАА, 8-нитрогуанин, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин, восстановленный глутатион, 4-гидрокси-2,3-ноненаль и МДА. Для определения статистической значимости различий использовался тест знаков Вилкоксона с оценкой точных значений p-values. На ящичковых диаграммах Тьюки (рис. 1, 2, 4–8) отражены интерквартильная широта («ящик»), медиана (горизонтальная линия) и средние величины («звездочки»). Т-образные линии демонстрируют межквартильный размах, кружки – статистические выбросы.

Результаты исследования

ОАА в группе пациентов с ХВГ С (F3-4) существенно отличалась от контроля и группы ХВГ С (F1-2). В то же время этот показатель в группе ХВГ В (F3-4) также отличался от контроля. То есть можно допустить, что значения данного показателя связаны со стадией фиброза, но не связаны с типом гепатита. Можно предположить, что изменения здесь наступают еще на стадии F1-2 при ХВГ В, и на стадии F3-4 при ХВГ С (рис. 1).

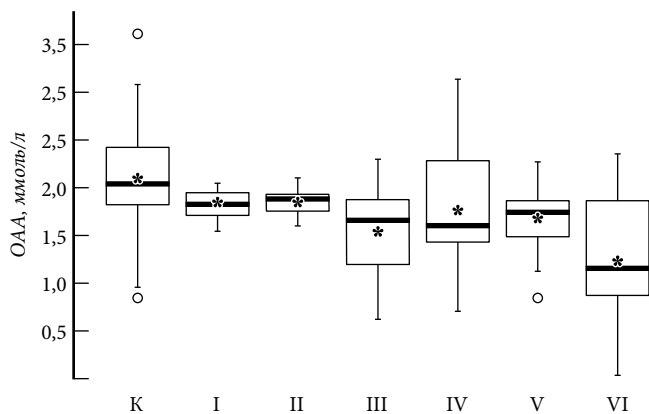


Рис. 1. ОАА сыворотки крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

К - контроль, I - ХВГ В (F0), II - ХВГ В (F1-2), III - ХВГ В (F3-4), IV - ХВГ С (F0), V - ХВГ С (F1-2), VI - ХВГ С (F3-4).

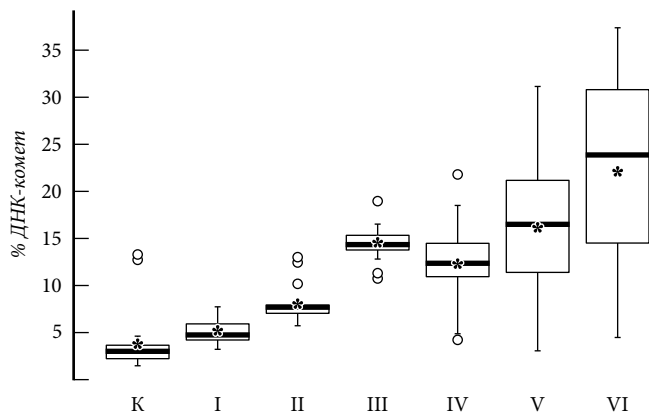


Рис. 2. Доля ДНК в хвосте комет лимфоцитов в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

К - контроль, I - ХВГ В (F0), II - ХВГ В (F1-2), III - ХВГ В (F3-4), IV - ХВГ С (F0), V - ХВГ С (F1-2), VI - ХВГ С (F3-4).

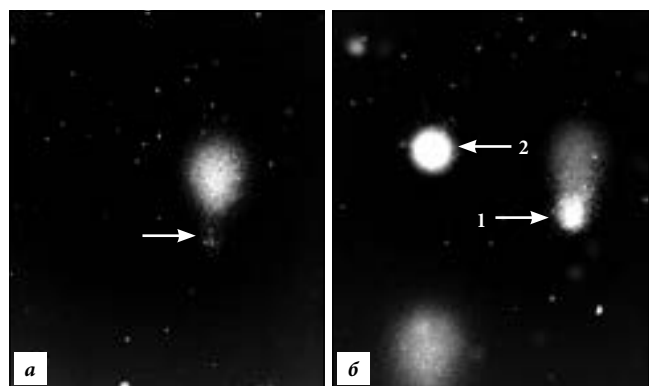


Рис. 3. Микрофотографии ДНК-комет:

а - ДНК-комета, соответствующая апоптотической клетке (стрелка) у пациента с ХВГ С (F3); б - ДНК-комета у пациента с ХВГ В (стрелка 1 - комета с 44,43% ДНК в хвосте, стрелка 2 - комета с 2,78% ДНК). Окр. этидиума бромидом, $\times 200$.

броза, но не связаны с типом гепатита. Можно предположить, что изменения здесь наступают еще на стадии F1-2 при ХВГ В, и на стадии F3-4 при ХВГ С (рис. 1).

Также обнаружено, что по следующим показателям есть значимые различия между группами пациентов с одинаковой стадией фиброза, но разными типами гепатита: доля ДНК в хвосте комет лимфоцитов для всех стадий фиброза (рис. 2, 3), содержание в сыворотке крови 8-нитрогуанина (рис. 4), 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (рис. 5), восстановленного глутатиона (рис. 6), МДА - только для степени F3-4 (рис. 7) и 4-гидрокси-2,3-ноненаля - только для степени F1-2 (рис. 8). То есть значения этих показателей были связаны не только с наличием гепатита и стадией фиброза, но и с типом гепатита. Из них по 8-гидрокси-2-дезоксигуанозину и восстановленному глутатиону изменения в группе пациентов с ХВГ С наступали, начиная с F0, а в группе пациентов с ХВГ В - с F1-2. По остальным показателям из данной категории изменения при гепатитах регистрировались уже со стадии F0.

Характеризуя течение ХВГ В, следует заметить, что внутри групп пациентов с различными стадиями фиброза соотносятся следующие показатели (по остальным связи со стадией не обнаружено): доля

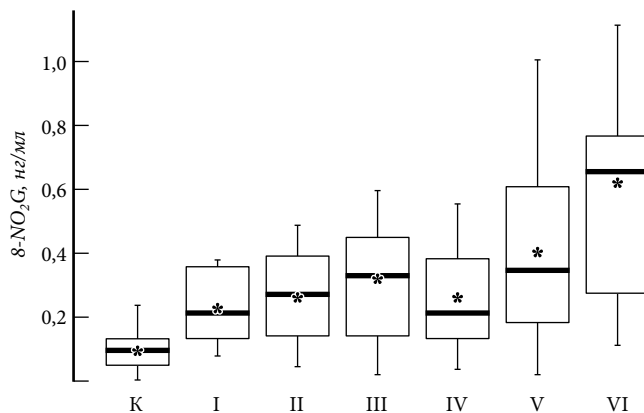


Рис. 4. Содержание 8-нитрогуанина в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

К - контроль, I - ХВГ В (F0), II - ХВГ В (F1-2), III - ХВГ В (F3-4), IV - ХВГ С (F0), V - ХВГ С (F1-2), VI - ХВГ С (F3-4).

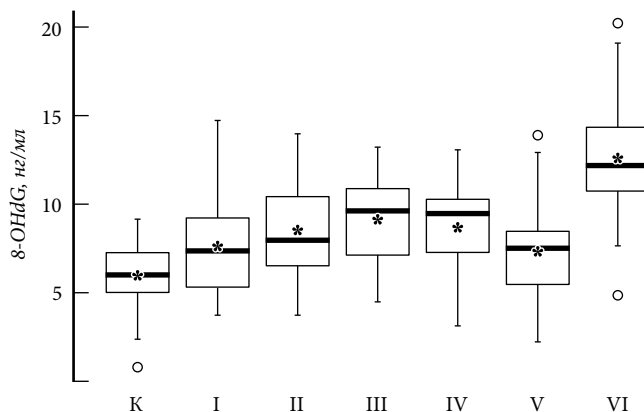


Рис. 5. Содержание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

К - контроль, I - ХВГ В (F0), II - ХВГ В (F1-2), III - ХВГ В (F3-4), IV - ХВГ С (F0), V - ХВГ С (F1-2), VI - ХВГ С (F3-4).

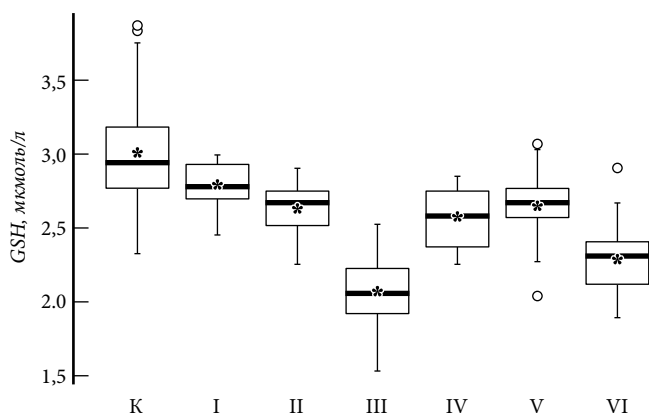


Рис. 6. Содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

K – контроль, *I* – XHG B (F0), *II* – XHG B (F1–2), *III* – XHG B (F3–4), *IV* – XHG C (F0), *V* – XHG C (F1–2), *VI* – XHG C (F3–4).

ДНК в хвосте комет лимфоцитов (значимы различия между всеми парами стадий фиброза), содержание в сыворотке крови МДА и 4-гидрокси-2,3-ноненаля (существенные изменения регистрировались при F3–4: значимые отличия от F0 и F1–2, при том, что различия между F0 и F1–2 оказались несущественными).

При XHG C связаны со стадией фиброза были уровни 8-нитрогуанина, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и доли ДНК в хвосте комет лимфоцитов (по остальным показателям подобных связей не обнаружено). Существенные изменения ОАА и уровней восстановленного глутатиона, МДА и 4-гидрокси-2,3-ноненаля в сыворотке крови регистрировались на стадии F3–4: значимые отличия от F0 и F1–2, при том, что различия между F0 и F1–2 оказались несущественными.

По умершим был проведен дескриптивный анализ, аналогичный тому, результаты которого представлены выше для живых пациентов. По аналогии, итоги тестов на сравнение средних значений показателей между различными группами умерших можно, кроме возраста, условно разделить на несколько категорий. При этом из-за малого размера выборки в качестве порогового уровня значимости использовано значение в 10% вместо 5% (табл. 1, 2).

Значимых различий в зависимости ни от типа гепатита для одинаковой степени фиброза печени, ни от степени фиброза для одинаковых типов гепатита по содержанию в крови 4-гидрокси-2,3-ноненаля не обнаружено. По данному показателю были значимые различия между контролем и группами с XHG B (F3–4) и XHG C (F3–4). Также обнаружены значимые различия в степени фиброза при одинаковых типах гепатита, но не между группами с XHG B и XHG C при одинаковой степени фиброза (табл. 1, 2):

- ♦ для ОАА в сыворотке крови при XHG C – между F3–4 и F0, и контролем;
- ♦ для восстановленного глутатиона в сыворотке крови при XHG C – между F3–4 и F0;
- ♦ для МДА в сыворотке крови при обоих типах гепатита – между F3–4 и F0, и контролем;

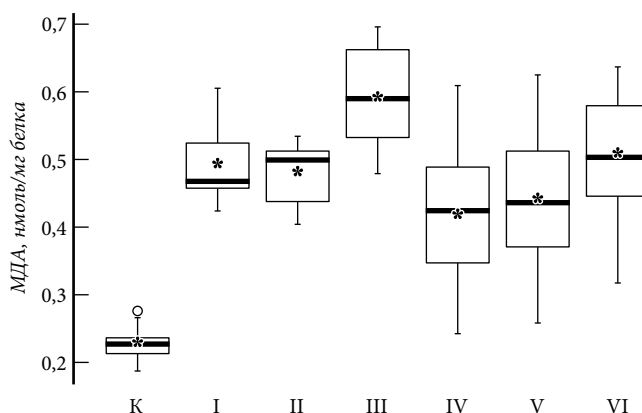


Рис. 7. Содержание МДА в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

K – контроль, *I* – XHG B (F0), *II* – XHG B (F1–2), *III* – XHG B (F3–4), *IV* – XHG C (F0), *V* – XHG C (F1–2), *VI* – XHG C (F3–4).

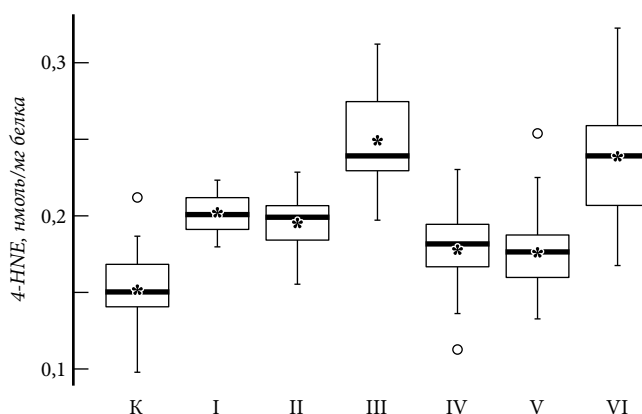


Рис. 8. Содержание 4-гидрокси-2,3-ноненаля в сыворотке крови в зависимости от типа гепатита и степени фиброза:

K – контроль, *I* – XHG B (F0), *II* – XHG B (F1–2), *III* – XHG B (F3–4), *IV* – XHG C (F0), *V* – XHG C (F1–2), *VI* – XHG C (F3–4).

- ♦ для МДА в ткани печени при XHG B – между F3–4 и остальными группами, включая контроль, при XHG C – между F3–4 и F0, и контролем;
- ♦ для 8-нитрогуанана в ткани печени при XHG C – между F3–4 и остальными группами, включая контроль, при XHG C – между F3–4 и F0, и F1–2;
- ♦ для доли ДНК в хвосте комет гепатоцитов при обоих типах гепатита – между всеми парами стадий фиброза печени, а также в парах отдельных стадий с контролем.

То есть можно предположить, что эти показатели связаны со стадией фиброза, но не сопряжены с типом гепатита. Для показателей, по которым зарегистрированы статистически значимые различия между контролем и группами с F0 (МДА в крови и ткани печень, % ДНК в хвосте комет гепатоцитов (только при XHG B), можно предположить, что изменения наступают еще на стадии F0, то есть связаны с наличием гепатита как такового.

Заметим, что по следующим показателям обнаружены значимые различия между группами пациентов с одинаковой стадией фиброза, но разными типами гепатита (табл. 1, 2):

Таблица 1

Значимость различий в средних показателях между группами умерших пациентов в зависимости от типа гепатита и степени фиброза в сыворотке крови

Показатель ^a	Группа	M	s	p-value тестов Манна-Уитни с коррекцией Холма						
				Контроль	ХВГ В			ХВГ С		
					F0	F1-2	F3-4	F0	F1-2	
ОАА, ммоль/л	Контроль	2,2	0,8							
	ХВГ В	F0	1,5	0,3	0,374					
		F1-2	2,0	0,3	1	0,77				
		F3-4	1,5	0,6	0,432	1	1			
	ХВГ С	F0	2,0	0,1	1	0,114	1	0,77		
		F1-2	1,6	0,6	0,705	1	1	1	0,936	
F3-4		1,2	0,4	0,063 ⁶	1	0,126	1	0,08 ⁶	1	
8-NO ₂ G, нг/мл	Контроль	0,1	0,0							
	ХВГ В	F0	0,2	0,0	<0,00 ⁶					
		F1-2	0,3	0,1	<0,001 ⁶	0,125				
		F3-4	0,4	0,0	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶			
	ХВГ С	F0	0,2	0,0	<0,001 ⁶	0,519	0,256	0,048 ⁶		
		F1-2	0,4	0,1	<0,001 ⁶	0,08 ⁶	0,519	0,519	0,096 ⁶	
F3-4		0,6	0,1	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,045 ⁶	0,048 ⁶	0,045 ⁶	0,084 ⁶	
8-OHdG, нг/мл	Контроль	6,2	0,9							
	ХВГ В	F0	7,7	0,4	0,016 ⁶					
		F1-2	8,1	0,4	<0,001 ⁶	0,165				
		F3-4	9,1	0,6	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,08 ⁶			
	ХВГ С	F0	11,1	1,2	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,06 ⁶		
		F1-2	12,4	0,9	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,165	
F3-4		13,6	1,7	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,045 ⁶	0,045 ⁶	0,088 ⁶	0,253	
GSH, мкмоль/л	Контроль	2,5	0,7							
	ХВГ В	F0	2,4	0,1	1					
		F1-2	2,4	0,1	1	1				
		F3-4	2,1	0,3	0,924	0,555	0,715			
	ХВГ С	F0	2,4	0,2	1	1	1	0,555		
		F1-2	2,3	0,2	1	1	1	1	1	
F3-4		1,8	0,2	0,187	0,063 ⁶	0,063 ⁶	0,288	0,063 ⁶	0,126	
4-HNE, нмоль/мл белка	Контроль	0,2	0,0							
	ХВГ В	F0	0,2	0,0	1					
		F1-2	0,2	0,0	1	1				
		F3-4	0,3	0,1	0,021 ⁶	0,114	0,16			
	ХВГ С	F0	0,2	0,0	1	1	1	0,114		
		F1-2	0,2	0,0	0,924	0,832	1	0,114	1	
F3-4		0,3	0,1	0,06 ⁶	0,16	1	1	0,448	1	
МДА, нмоль/мл белка	Контроль	0,3	0,0							
	ХВГ В	F0	0,4	0,1	0,017 ⁶					
		F1-2	0,5	0,0	<0,001 ⁶	0,135				
		F3-4	0,5	0,0	<0,001 ⁶	0,056 ⁶	1			
	ХВГ С	F0	0,4	0,1	0,032 ⁶	1	0,39	0,18		
		F1-2	0,5	0,1	<0,001 ⁶	0,056 ⁶	1	1	0,175	
F3-4		0,6	0,1	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,11	0,11	0,056 ⁶	0,135	
%DNAI	Контроль	3,8	1,7							
	ХВГ В	F0	5,1	0,8	0,06 ⁶					
		F1-2	7,9	1,6	0,034 ⁶	0,05 ⁶				
		F3-4	14,7	3,9	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶			
	ХВГ С	F0	10,5	2,2	0,018 ⁶	0,048 ⁶	0,234	0,234		
		F1-2	15,8	2,1	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,631	0,048 ⁶	
F3-4		21,2	1,8	<0,001 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	0,048 ⁶	

^a 8-NO₂G – 8-нитрогуанан, 8-OHdG – 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин, GSH – восстановленный глутатион, 4-HNE – 4-гидрокси-2,3-ноненаль, %DNAI – доля ДНК-комет в хвосте лимфоцита.

⁶ p-value <10%.

Таблица 2

Значимость различий в средних показателях между группами умерших пациентов в зависимости от типа гепатита и степени фиброза в гомогенате ткани печени

Показателя	Группа	M	s	p-value тестов Манна-Уитни с коррекцией Холма						
				Контроль	ХВГ В			ХВГ С		
					F0	F1-2	F3-4	F0	F1-2	
ОАА, ммоль/л	Контроль	19,4	2,0							
	ХВГ В	F0	12,4	1,8	<0,001 ⁶					
		F1-2	15,5	1,8	0,018 ⁶	0,12				
		F3-4	10,6	2,1	<0,001 ⁶	0,75	0,06 ⁶			
	ХВГ С	F0	19,5	0,8	1	0,056 ⁶	0,056 ⁶	0,056 ⁶		
		F1-2	14,0	2,7	0,018 ⁶	1	1	0,468	0,056 ⁶	
F3-4		9,7	1,5	<0,001 ⁶	0,12	0,048 ⁶	1	0,048 ⁶	0,09 ⁶	
8-NO ₂ G, нг/мл	Контроль	1,9	0,6							
	ХВГ В	F0	2,0	0,0	1					
		F1-2	2,0	0,1	1	1				
		F3-4	2,7	0,3	0,104	0,064 ⁶	0,064 ⁶			
	ХВГ С	F0	1,9	0,2	1	1	1	0,064 ⁶		
		F1-2	2,3	0,2	0,423	0,896	0,624	0,275	0,37	
F3-4		3,6	0,6	<0,001 ⁶	0,06 ⁶	0,06 ⁶	0,264	0,06 ⁶	0,06 ⁶	
8-OHdG, нг/мл	Контроль	26,1	3,6							
	ХВГ В	F0	71,6	4,3	<0,001 ⁶					
		F1-2	74,9	4,8	<0,001 ⁶	0,796				
		F3-4	80,8	4,1	<0,001 ⁶	0,052 ⁶	0,545			
	ХВГ С	F0	51,7	11,9	0,016 ⁶	0,052 ⁶	0,052 ⁶	0,052 ⁶		
		F1-2	68,4	9,0	<0,001 ⁶	0,796	0,796	0,12	0,222	
F3-4		83,7	4,5	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,12	0,796	0,045 ⁶	0,09 ⁶	
GSH, мкмоль/л	Контроль	23,5	2,0							
	ХВГ В	F0	19,4	0,8	0,018 ⁶					
		F1-2	18,1	1,1	<0,001 ⁶	0,385				
		F3-4	14,6	1,4	<0,001 ⁶	0,06 ⁶	0,09 ⁶			
	ХВГ С	F0	22,6	1,9	1	0,06 ⁶	0,06 ⁶	0,06 ⁶		
		F1-2	16,8	2,5	0,018 ⁶	0,385	1	0,545	0,06 ⁶	
F3-4		15,3	2,7	<0,001 ⁶	0,06 ⁶	0,256	1	0,048 ⁶	1	
4-HNE, нмоль/мг белка	Контроль	4,8	0,4							
	ХВГ В	F0	6,1	0,5	0,018 ⁶					
		F1-2	7,2	0,6	<0,001 ⁶	0,15				
		F3-4	10,1	2,3	<0,001 ⁶	0,056 ⁶	0,056 ⁶			
	ХВГ С	F0	4,7	0,8	1	0,09 ⁶	0,056 ⁶	0,056 ⁶		
		F1-2	6,6	1,3	0,105	0,8	1	0,096	0,275	
F3-4		10,6	2,5	<0,001 ⁶	0,051 ⁶	0,051 ⁶	1	0,051 ⁶	0,056 ⁶	
МДА, нмоль/мг белка	Контроль	20,7	6,6							
	ХВГ В	F0	54,2	4,7	<0,001 ⁶					
		F1-2	58,0	7,1	<0,001 ⁶	1				
		F3-4	70,7	6,8	<0,001 ⁶	0,052 ⁶	0,135			
	ХВГ С	F0	48,4	2,2	<0,001 ⁶	0,259	0,259	0,052 ⁶		
		F1-2	55,2	4,9	<0,001 ⁶	1	1	0,052 ⁶	0,259	
F3-4		67,9	4,5	<0,001 ⁶	0,045 ⁶	0,135	1	0,045 ⁶	0,052 ⁶	
%DNAt	Контроль	19,9	6,6							
	ХВГ В	F0	27,3	1,7	0,096					
		F1-2	34,0	1,9	0,019 ⁶	0,052 ⁶				
		F3-4	42,6	5,7	<0,001 ⁶	0,052 ⁶	0,052 ⁶			
	ХВГ С	F0	23,2	3,9	0,37	0,234	0,052 ⁶	0,052 ⁶		
		F1-2	33,1	2,9	0,019 ⁶	0,06 ⁶	0,522	0,052 ⁶	0,052 ⁶	
F3-4		48,9	2,4	<0,001 ⁶	0,051 ⁶	0,051 ⁶	0,184	0,051 ⁶	0,051 ⁶	

^a 8-NO₂G – 8-нитрогуанан, 8-OHdG – 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин, GSH – восстановленный глутатион, 4-HNE – 4-гидрокси-2,3-ноненаль, %DNAt – доля ДНК-комет в хвосте гепатоцита.

⁶ p-value <10%.

- ♦ для 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина сыворотки крови и для % ДНК в хвосте комет лимфоцитов (для всех значений F);
- ♦ для 8-нитрогуанана сыворотки крови (только для F3–4);
- ♦ для ОАА, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, восстановленного глутатиона и 4-гидрокси-2,3-ноненаля ткани печени (только для F0).

То есть значения этих показателей, возможно, были соотнесены не только с наличием ХВГ и стадией фиброза, но и с типом ХВГ.

В целом, внутри группы пациентов с ХВГ В со стадией фиброза оказались связаны следующие показатели (табл. 1, 2):

- ♦ 8-нитрогуанан и 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин сыворотки крови, восстановленных глутатион и 4-гидрокси-2,3-ноненаль ткани печени, % ДНК в хвосте комет лимфоцитов и гепатоцитов (значимы различия между всеми парами F);
- ♦ 4-гидрокси-2,3-ноненаль сыворотки крови, 8-нитрогуанан и МДА ткани печени (значимы только различия между F3–4 и F0, и F1–2);
- ♦ МДА сыворотки крови (значимы только различия между F0 и F1–2, и F3–4);
- ♦ ОАА ткани печени (значимы различия между F0 и F1–2, а также между F3–4 и F1–2);
- ♦ 8-нитрогуанан ткани печени (значимы различия только между F3–4 и F0).

В целом, внутри группы пациентов с ХВГ С связаны со стадией фиброза были следующие показатели (табл. 1, 2):

- ♦ уровни 8-нитрогуанана и МДА сыворотки крови, ОАА, 8-нитрогуанана, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, 4-гидрокси-2,3-ноненаля и МДА ткани печени, % ДНК в хвостах комет лимфоцитов и гепатоцитов (значимы различия между всеми парами F);
- ♦ уровень восстановленного глутатиона сыворотки крови (значимы различия между F3–4 и F0, и F1–2);
- ♦ уровень восстановленного глутатиона ткани печени (значимы различия между F0 и F1–2, и F3–4);
- ♦ уровни ОАА, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и 4-гидрокси-2,3-ноненаля сыворотки крови (значимы различия между F3–4 и F0).

Заметим, что различия между показателями крови и показателями ткани печени абсолютно по всем параметрам, как в целом по выборке умерших, так и по отдельным ее подгруппам, статистически значимы.

Между живыми и умершими пациентами было проведено сравнение средних значений по следующим показателям сыворотки крови: ОАА, 8-нитрогуанан, 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин, восстановленный глутатион, 4-гидрокси-2,3-ноненаль, МДА и % ДНК в хвосте комет. В целом, значимые различия между живыми и умершими обнаруживались только:

- ♦ по 8-гидрокси-2-дезоксигуанозину между контрольными и пациентами с ХВГ С с F0 или F1–2;
- ♦ по восстановленному глутатиону среди всех пациентов, а также среди пациентов контрольной группы, пациентов с ХВГ В (в том числе со стадией F0 или

F1–2), а также среди пациентов с ХВГ С и стадией F1–2 или F3–4;

- ♦ по 4-гидрокси-2,3-ноненалу среди всех пациентов, а также среди пациентов контрольной группы, пациентов с ХВГ В (в том числе со стадией F3–4), а также пациентов с ХВГ С со стадией F1–2;
- ♦ по МДА среди пациентов с ХВГ В (в том числе со стадией F0 или F3–4) или с ХВГ С (в том числе со стадией F3–4).

Следует обратить внимание на то, что эти различия зафиксированы при том, что группы умерших и живых лиц существенно различались по возрасту. Если уровень перечисленных показателей связан с возрастом пациента, тогда указанные различия могут, по крайней мере отчасти, объясняться разницей в возрасте, а не статусом индивида (жив/мертв).

Обсуждение полученных данных

Характеризуя состояние ДНК, как в целом макроорганизма, так и отдельно лимфоцитов следует заметить несколько важных моментов. Во-первых, непосредственно степень повреждения ДНК лимфоцитов периферической крови достоверно отличалась от контрольных цифр даже при отсутствии изменений в ткани печени. Причем на аналогичных стадиях фиброза параметры между типами гепатита были разными. Наименьший % ДНК в хвосте комет имели пациенты с ХВГ В – 5,1 (против 12,7% при ХВГ С). Также следует заметить, что с прогрессированием заболевания степень деструкции ДНК в этих двух группах не выравнивалась. Значения, характеризующие стадию цирроза печени при ХВГ В, практически сопоставимы со стадией F0 при ХВГ С. Из чего следует вывод о большей генотоксичности вируса гепатита С [1, 3].

Во-вторых, динамика изменений уровня маркеров оксидативного и нитрозативного повреждения ДНК – 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и 8-нитрогуанана – в целом соответствует таковой в отношении степени деструкции ДНК [2]. Таким образом, мы можем говорить о значимом вкладе в деструкцию процессов оксидативного и нитрозативного стрессов [11, 14] (причем эти изменения начинались до формирования фиброза у пациентов обеих групп).

В-третьих, буферная емкость антиоксидантной системы организма в ходе естественного течения вирусных гепатитов истощается. Об этом свидетельствует отрицательная динамика интегративного показателя – ОАА, включающего в себя как низкомолекулярные антиоксиданты, так и высокофункциональные белковые молекулы. При ХВГ С, очевидно в силу большей генотоксичности вируса и индукции более выраженного оксидативного и нитрозативного стресса, антиоксиданты истощаются быстрее. Такая же тенденция характерна и для восстановленного глутатиона [13, 14].

Несмотря на это, другой показатель – МДА, косвенно характеризующий процесс перекисного окисления липидов, имел несколько иную динамику. Существенное увеличение его концентрации было характерно для

пациентов с ХВГ В, причем межгрупповые отличия с ХВГ С здесь оказались статистически значимы. Следует заметить, что оксидативный стресс помимо окисления липидов включает в себя окисление и нуклеиновых кислот, и углеводов, и отдельных компонентов клетки.

В-четвертых, оксидативный и нитрозативный стресс вызывает в клетке значимые нарушения целостности многих мембранных органелл. Так, при окислении специфического липида мембран митохондрий – кардиолипина – обнаруживается 4-гидрокси-2,3-ноненаль. Динамика его накопления в крови при вирусных гепатитах имеет тенденцию к постепенному увеличению по мере усиления фиброза. Причем межгрупповые отличия на одинаковых стадиях фиброза при разных типах гепатита оказываются недостоверными [13].

Изменения в ткани печени при хронических вирусных гепатитах в целом сопоставимы с таковыми в сыворотке крови по всем показателям. Но ввиду большей концентрации ферментов и продуктов окисления непосредственно внутри клеток значения каждого из параметров закономерно в несколько раз выше таковых в сыворотке крови.

Литература / References

1. Кропотов А.В., Челомин В.П., Слободскова В.В. [и др.]. Оценка генотоксичности тетрахлолорметана и защитного действия силибинина и хаурантина с помощью метода ДНК-комет в печени крыс // Тихоокеанский мед. журнал. 2013. № 2. С. 63–66. Kropotov A.V., Chelomin V.P., Slobodskova V.V. [et al.]. Estimating carbon tetrachloride toxicity and protective action of silibinin and haurantian using DNA-comet assay in rat liver // Pacific Medical Journal. 2013. No. 2. P. 63–66.
2. Михайлов А.О., Попов А.Ф., Иванова Н.С. [и др.]. Деструкция, окисление ДНК и липидов мембран митохондрий при хронических вирусных гепатитах С, В // Инфекционные болезни. 2018. Т. 16, № 1. С. 15–21. Mikhaylov A.O., Popov A.F., Ivanova N.S. [et al.]. Destruction, oxidation of DNA and lipids of mitochondrial membranes in chronic viral hepatitis C, B // Infectious Diseases. 2018. Vol. 16, No. 1. P. 15–21.
3. Михайлов А.О., Попов А.Ф., Иванова Н.С., Симакова А.И. Исследование повреждений ДНК лимфоцитов у больных хроническим вирусным гепатитом в методе ДНК-комет // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22, № 2. С. 64–68. Mikhaylov A.O., Popov A.F., Ivanova N.S., Simakova A.I. The investigation of DNA damage in lymphocytes by comet assay in chronic viral hepatitis B patients // Epidemiology and Infectious Diseases. 2017. Vol. 22, No. 2. P. 64–68.
4. Михайлов А.О., Попов А.Ф., Иванова Н.С., Симакова А.И. Повреждения ДНК лимфоцитов при хронических вирусных гепатитах В, С // Журнал инфектологии. 2017. Т. 9, № 2. С. 29–36. Mikhaylov A.O., Popov A.F., Ivanova N.S., Simakova A.I. DNA damage in lymphocytes in chronic viral hepatitis B, C // Journal Infectology. 2017. Vol. 9, No. 2. P. 29–36.
5. Попов А.Ф., Михайлов А.О., Иванова Н.С., Симакова А.И. Метод ДНК-комет в диагностике фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20, № 2. С. 29–33. Popov A.F., Mikhaylov A.O., Ivanova N.S., Simakova A.I. Method of DNA-comet assay in the diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis C // Epidemiology and Infectious Diseases. 2015. Vol. 20, No. 2. P. 29–33.
6. Чернигина И.А., Щербатюк Т.Г. Новая версия метода ДНК-комет // Современные технологии в медицине. 2016. Т. 8, № 1. С. 20–27. Chernigina I.A., Shcherbatyuk T.G. A new version of comet assay // Modern Technologies in Medicine. 2016. Vol. 8, No. 1. P. 20–27.

7. Bolukbas C., Bolukbas F.F., Kocyigit A. [et al.]. Relationship between levels of DNA damage in lymphocytes and histopathological severity of chronic hepatitis C and various clinical forms of hepatitis B // J. Gastroenterol. Hepatol. 2006. Vol. 21, No. 3. P. 610–616.
8. Cao L., Quan Xi-B., Zeng W.-J. [et al.]. Mechanism of hepatocyte apoptosis // J. Cell Death. 2016. No. 9. P. 19–29.
9. Grossi S., Sumberaz A., Gosmar M. [et al.]. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C viruses // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2008. Vol. 20, No. 1. P. 22–25.
10. Ivanov A.I., Valuev-Elisston V.T., Tyurina D.A. [et al.]. Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis // Oncotarget. 2017. Vol. 8, No. 3. P. 3895–3932.
11. Iwakiri Ya. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase // Clin. Mol. Hepatol. 2015. Vol. 21, No. 4. P. 319–325.
12. Iwakiri Ya., Kim M.Y. Nitric oxide in liver diseases // Trends Pharmacol. Sci. 2015. Vol. 36, No. 8. P. 524–536.
13. Kawanishi S., Ohnishi S., Ma N. [et al.]. Nitritative and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells // Genes and Environment. 2016. doi: 10.1186/s41021-016-0070-8 (date of access: 03.08.2018).
14. Li P., Ramm G.A., Macdonald G.A. Value of the 8-oxodG/dG ratio in chronic liver inflammation of patients with hepatocellular carcinoma // Redox Biology. 2016. doi: 10.1016/j.redox.2016.02.003 (date of access: 03.08.2018).
15. Olive P.L., Banáth J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // Nature Protocols. 2006. Vol. 1, No. 1. P. 23–29.

Поступила в редакцию 19.09.2018.

OXIDATIVE AND NITROSATIVE DNA DAMAGE IN HEPATIC FIBROSIS PATHOGENESIS IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS

A.O. Mikhaylov¹, A.F. Popov², V.A. Ivanis², E.V. Khamueva¹, N.S. Ivanova², A.I. Simakova²

¹ Regional Clinical Hospital No. 2 (55 Russkaya St. Vladivostok 690105 Russian Federation), ² Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)

Objective. Despite a large number of studies on chronic viral hepatitis, many issues related to its pathogenesis remain unsettled. First of all, it refers to pathogenic effects of the viruses themselves, the nature and patterns of the host organism's response to the pathogen, the formation of liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and several other aspects.

Methods. In the serum of 150 patients with chronic viral hepatitis B and C and in the serum and in the liver homogenates taken after 31 autopsies of persons who died of cirrhosis in the outcome of chronic viral hepatitis, the total antioxidant activity was studied, the content of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-nitroguanine, reduced glutathione, malonic dialdehyde and 4-hydroxy-2,3-nonenal. Also, the degree of DNA destruction in peripheral blood lymphocytes and hepatocytes was analyzed using the comet assay.

Results. It has been established that DNA destruction of hepatocytes and peripheral blood lymphocytes is one of the leading components of the formation of hepatic fibrosis in chronic viral hepatitis B and C and can be considered as its pathognomonic marker. One of the leading mechanisms of this process can be called the enhancement of oxidative and nitrosative processes.

Conclusions. There is a direct link between DNA damage and the severity of sclerotic changes in the liver. Oxidative and nitrosative stress in hepatocytes and lymphocytes causes significant violations of the integrity of membrane organelles. Biochemical changes in the liver tissue during chronic viral hepatitis B and C are generally comparable to those in the serum in all respects, which makes them promising in terms of developing algorithms for diagnosing hepatic fibrosis.

Keywords: DNA comet assay, oxidative and nitrosative stress, hepatocytes, lymphocytes