

УДК 577.17:616.36-002.14:612.111

© Коллектив авторов

## СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА В ЭРИТРОЦИТАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТАХ

*В.И. Кулинский<sup>1\*</sup>, З.А. Леонова<sup>1</sup>, Л.С. Колесниченко<sup>2</sup>,  
И.В. Малов<sup>3</sup>, Ю.А. Данилов<sup>3</sup>*

Кафедры биохимии<sup>1</sup>, бионеорганической и биоорганической химии<sup>2</sup> и  
инфекционных болезней<sup>3</sup> Иркутского государственного медицинского  
университета; тел.(395)224-4261; факс: (395)224-0826;  
эл. почта: kulinsky@pp.irkutsk.ru

При всех 5 острых (ОВГ) и хронических вирусных гепатитах (ХВГ) в эритроцитах увеличиваются активности глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР) и снижается концентрация восстановленного глутатиона (GSH); в плазме аккумулируются ГПО, глутатионтрансфераза (ГТ) и  $\gamma$ -глутамилтрансфераза (ГГТ). Только при ОВГ в плазме возрастают GSH и ГР. При ХВГ С увеличивается активность ГТ эритроцитов. Очевидно, изменения в системе глутатиона в эритроцитах являются реакциями на оксидативный стресс, а в плазме крови – последствиями воспаления и цитолиза гепатоцитов. При средней тяжести ОВГ В изменения были более выражены, чем при тяжелом течении. Выявленные сдвиги имеют патогенетическое значение и могут быть использованы как дополнение к комплексной диагностике. Они существенно отличаются от изменений при хронических заболеваниях желчного пузыря. Аргументируется необходимость раздельного исследования системы глутатиона в эритроцитах и плазме, но не в цельной крови.

**Ключевые слова:** система глутатиона, вирусные гепатиты.

**ВВЕДЕНИЕ.** В патогенезе ВГ важную роль играет накопление активных форм кислорода (АФК) и оксидативная модификация нуклеиновых кислот, белков и липидов [1-3]. Хорошо известно, что глутатион и ферменты его метаболизма – одна из важнейших антиоксидатных систем, которая защищает от вирусного воспаления [2-6]. Однако данные об этой системе при ВГ неоднозначны. Исследование этой проблемы началось в конце 70-ых годов, в 90-ые годы появились важные работы А.С. Логинова [4]. В базе данных PubMed и журналах с 1965 г. обнаружено 53 работы, из них 26 по системе глутатиона в эритроцитах и плазме/сыворотке с полными диагнозами и статобработкой. Из 45 возможных вариантов (9 показателей системы глутатиона при 5 ВГ) были получены данные для 21 (47%). Результаты, совпадающие минимум в 2 работах, описаны для 5 вариантов, то есть только для 11%. В остальных случаях данные противоречивы (9%), неоднозначны (11%) или получены в единичных работах (16%). Поэтому нет полного представления о влиянии ВГ на систему глутатиона крови. Ни при одном заболевании не проводилось комплексное исследование всех 9 показателей системы глутатиона параллельно в эритроцитах и плазме. Биохимическая интерпретация описанных сдвигов приводится редко и неполно. Целью нашей работы было выявить в комплексном исследовании сдвиги в системе глутатиона эритроцитов и плазмы, провести сравнительный анализ и оценить возможность её патогенетического и диагностического значения при ВГ.

\*Адресат для переписки

## СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА ПРИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТАХ

**МЕТОДИКА.** Исследовано 90 больных, в том числе 14 с ОБГ А, 39 с ОБГ В, 15 с ХВГ В, 5 с ОБГ С и 17 с ХВГ С. Диагнозы ставили на основании анамнеза, клинической картины, резкого увеличения в крови билирубина и активности aminotransferаз, особенно АлАТ, определения вирусных маркеров методом ИФА, а для некоторых больных – ПЦР. В контрольной группе было 23 практически здоровых человека с близким распределением по полу и возрасту. Кровь брали утром натощак в пробирку с гепарином, эритроциты и плазму разделяли центрифугированием. Эритроциты промывали 0,9% NaCl и лизировали холодной дистиллированной водой. В лизатах и плазме стандартными спектрофотометрическими методами, как описано ранее [7], определяли активность ГТ (по конъюгации GSH с 2,4-динитрохлорбензолом), ГР (по убыли NADPH при восстановлении GSSG), ГПО (по убыли NADPH в сопряженной системе с ГР при восстановлении t-бутилгидропероксида) и ГГТ (по накоплению *n*-нитроанилида), а после осаждения белков 5% сульфосалициловой кислотой – GSH (по реакции с 5,5'-дитиобис-(2-нитробензоатом)). В статистическом анализе количественных данных использовали сравнение дисперсий по критерию F Фишера, при отсутствии их значимых различий средние сравнивали по критерию t Стьюдента, при наличии значимых различий дисперсий - по критерию t Велча; для качественных показателей (частот) применяли критерий  $\chi^2$ ; проводили корреляционный анализ [8].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Наиболее общие сдвиги, характерные для всех 5 ВГ, – это увеличение в эритроцитах (табл. 1) активности ГПО (в среднем на 56-89 %) и ГР (на 38-68%) и снижение концентрации GSH (на 23-39%), в плазме (табл. 2) – аккумуляция ГТ (на 124-912 %), ГПО (на 72-151 %) и ГГТ (на 93-181%). Только при трех ОБГ в плазме увеличивается активность ГР (на 38-50%) и концентрация GSH (на 42-74%), а аккумуляция ГТ при ОБГ В и С возрастает в среднем в 9-10 раз (у отдельных больных – до 30 раз), в то время как при ОБГ А, ХВГ В и С – только в 2-3 раза. Сравнение при ОБГ В групп средней тяжести и тяжелой (табл. 3) показало, что в первой из них из 9 показателей состояния системы глутатиона значимые изменения были в восьми (кроме ГТ эритроцитов), во второй – только в четырех (GSH и ГПО эритроцитов, ГТ и ГГТ плазмы), различия этих частот по критерию  $\chi^2$  значимы ( $p < 0,05$ ). У тяжелых больных три показателя (ГР эритроцитов, GSH и ГПО плазмы) не отличались от нормы, увеличение ГР плазмы стало незначимым, а аккумуляция в плазме ГТ снизилась в 4,5 раза по сравнению со среднетяжелым течением.

Таблица 1. Система глутатиона в эритроцитах при вирусных гепатитах.

Форма гепатита	GSH, ммоль/мл	ГТ, нмоль/мин на 1 мг белка	ГПО, нмоль/мин на 1 мг белка	ГР, нмоль/мин на 1 мг белка
Контроль n=23	1,57±0,12	6,08±0,55	7,51±0,68	3,15±0,16
ОБГ А n=14	1,21±0,094 <sup>а</sup>	6,24±0,56	14,2±1,71 <sup>б</sup>	5,28±0,71 <sup>б</sup>
ОБГ В n=39	1,04±0,055 <sup>в</sup>	6,66±0,86	12,9±2,27 <sup>а</sup>	5,00±0,34 <sup>в</sup>
ХВГ В n=15	0,96±0,070 <sup>в</sup>	6,25±0,58	11,73±1,67 <sup>а</sup>	5,29±0,61 <sup>в</sup>
ОБГ С n=5	1,12±0,071 <sup>б</sup>	7,61±2,46	12,6±1,47 <sup>б</sup>	4,36±0,43 <sup>б</sup>
ХВГ С n=17	1,05±0,070 <sup>в</sup>	7,35±1,50	12,3±2,00 <sup>а</sup>	5,21±0,80 <sup>а</sup>

Примечание. Здесь и в таблицах 2 и 3 представлены средние арифметические ( $\bar{X}$ ) и стандартные ошибки средней ( $S_x$ ). Значимость различий: а –  $p < 0,05$ , б –  $p < 0,01$ , в –  $p < 0,001$  (сравнение с контролем).

Таблица 2. Система глутатиона в плазме крови при вирусных гепатитах.

Форма гепатита	GSH, нмоль/мл	ГТ, нмоль/мин на 1 мг белка	ГПО, нмоль/мин на 1 мг белка	ГР, нмоль/мин на 1 мг белка	ГГТ, мкмоль/мин на 1 мл
Контроль n=23	19±2,0	0,25±0,021	0,97±0,042	0,40±0,021	75±6,0
ОВГ А n=14	27±2,1 <sup>а</sup>	0,76±0,093 <sup>в</sup>	2,43±0,37 <sup>а</sup>	0,60±0,088 <sup>а</sup>	161±19 <sup>б</sup>
ОВГ В n=39	30±2,7 <sup>б</sup>	2,26±0,91 <sup>а</sup>	2,04±0,38 <sup>а</sup>	0,56±0,063 <sup>а</sup>	186±34 <sup>б</sup>
ХВГ В n=15	23±4,8	0,56±0,053 <sup>в</sup>	1,77±0,13 <sup>в</sup>	0,43±0,017	145±13 <sup>в</sup>
ОВГ С n=5	33±2,1 <sup>а</sup>	2,53±0,46 <sup>в</sup>	1,99±0,26 <sup>б</sup>	0,55±0,063 <sup>а</sup>	211±34 <sup>в</sup>
ХВГ С n=17	21±4,7	0,78±0,063 <sup>в</sup>	1,67±0,18 <sup>б</sup>	0,46±0,058	192±25 <sup>б</sup>

Таблица 3. Система глутатиона крови при среднетяжелом и тяжелом остром вирусном гепатите В.

Тяжесть	GSH, нмоль/мл	ГТ, нмоль/мин на 1 мг белка	ГПО, нмоль/мин на 1 мг белка	ГР, нмоль/мин на 1 мг белка	ГГТ, мкмоль/мин на 1 мл
<b>Эритематозы</b>					
Контроль n=23	1,57±0,12	6,08±0,55	7,51±0,68	3,15±0,16	—
Средней тяжести n=24	1,08±0,06 <sup>б</sup>	6,63±1,05	13,5±2,35 <sup>а</sup>	5,70±0,53 <sup>в</sup>	—
Тяжелые n=10	0,99±0,14 <sup>б</sup>	6,99±1,16	12,6±1,88	3,84±0,62 <sup>к</sup>	—
<b>Пиксисы</b>					
Контроль n=23	19±2,0	0,25±0,021	0,97±0,042	0,40±0,021	75±6,0
Средней тяжести n=24	31,0±2,4 <sup>а</sup>	3,24±0,12 <sup>в</sup>	2,25±0,31 <sup>в</sup>	0,63±0,10 <sup>а</sup>	173±14 <sup>б</sup>
Тяжелые n=10	22,0±3,2 <sup>к</sup>	0,91±0,12 <sup>в,м</sup>	1,31±0,33 <sup>к</sup>	0,52±0,13	192±16 <sup>в</sup>

Примечание: а-в – отличие от контроля, к-м – отличие групп с разным течением; а,к –  $p<0,05$ , б,л –  $p<0,01$ , в,м –  $p<0,001$ .

Общепризнано, что основной причиной выраженной гиперферментемии при воспалительных заболеваниях является увеличение проницаемости клеточных мембран из-за накопления АФК и оксидативной модификации молекул липидов и белков. Еще более это выражено при цитолизе, происходящем при некрозе (но не апоптозе, при котором содержимое клеток остается внутри фрагментов мембран). При ВГ это проявляется в аккумуляции в крови АлАТ и в меньшей степени АсАТ.

Именно такие сдвиги – гиперферментемия со стороны всех 4 энзимов метаболизма глутатиона и накопление в плазме самого трипептида обнаружены нами. Выход в плазму ГР и GSH только при острых, но не хронических ВГ явно связан с тем, что при первых намного больше интенсивность воспаления и цитолиза. Максимальная аккумуляция в плазме ГТ, средняя выраженность сдвигов ГПО и ГГТ и минимальное увеличение ГР соответствуют ряду активности этих ферментов в нормальной печени [7]. Вероятно, при хронических гепатитах этим сдвигам способствует увеличение в гепатоцитах активности ГТ > ГПО > ГР [4]. Наибольшая выраженность аккумуляции в плазме ГТ при острых ВГ В и С соответствует максимальному развитию при них некроза гепатоцитов [9]. Печеночное происхождение ГТ плазмы доказывается тем, что в плазме аккумулируется максимально содержащийся в гепатоцитах  $\alpha$ -изофермент ГТ, а не характерный для эритроцитов  $\pi$ -изофермент [10].

Увеличение в плазме крови активности мембранного фермента ГГТ можно объяснить индукцией ГГТ при оксидативном стрессе [11, 12] и повреждением мембран. Очевидно, при ВГ повреждаются не только гепатоциты, но и желчные протоки, в которых активность ГГТ намного выше. Свой вклад может вносить и умеренный внутрипеченочный холестаз. Более высокие показатели ГГТ обнаружены нами при ОБГ В и С и ХВГ С – в 2,5-2,8 раза, умеренные – при ХВГ С и ОБГ А – примерно в 2 раза. Но эти данные свидетельствуют, что обтурация желчных протоков отсутствовала. Следовательно, распространенное мнение, что аккумуляция ГГТ в плазме является в основном (или даже только) холестатическим симптомом, явно упрощает ситуацию. Мы подтвердили накопление ГГТ в плазме крови и при гепатитах без обструкции желчных путей, что не дает возможности разграничить холестатический и гепатоцеллюлярный типы патологии [13].

Однако изменения метаболизма глутатиона происходят не только в плазме крови. Увеличение в эритроцитах активности ГР и ГПО при ВГ естественно связать с активацией этих ферментов в эритроцитах или их индукцией в клетках-предшественниках. Это, очевидно, реакция на оксидативный стресс. Исследуемые ферменты функционируют как антиоксидативные: ГПО восстанавливает все виды перекисей, ГТ – только органические перекиси, а ГР – окисленный глутатион в GSH [14]; кроме того, ГТ конъюгирует с GSH цитотоксичные альдегиды, включая наиболее активный 4-гидроксиноненаль. Снижение концентрации GSH в эритроцитах при ВГ скорее всего результат использования GSH для обезвреживания АФК, альтернатива – снижение биосинтеза GSH.

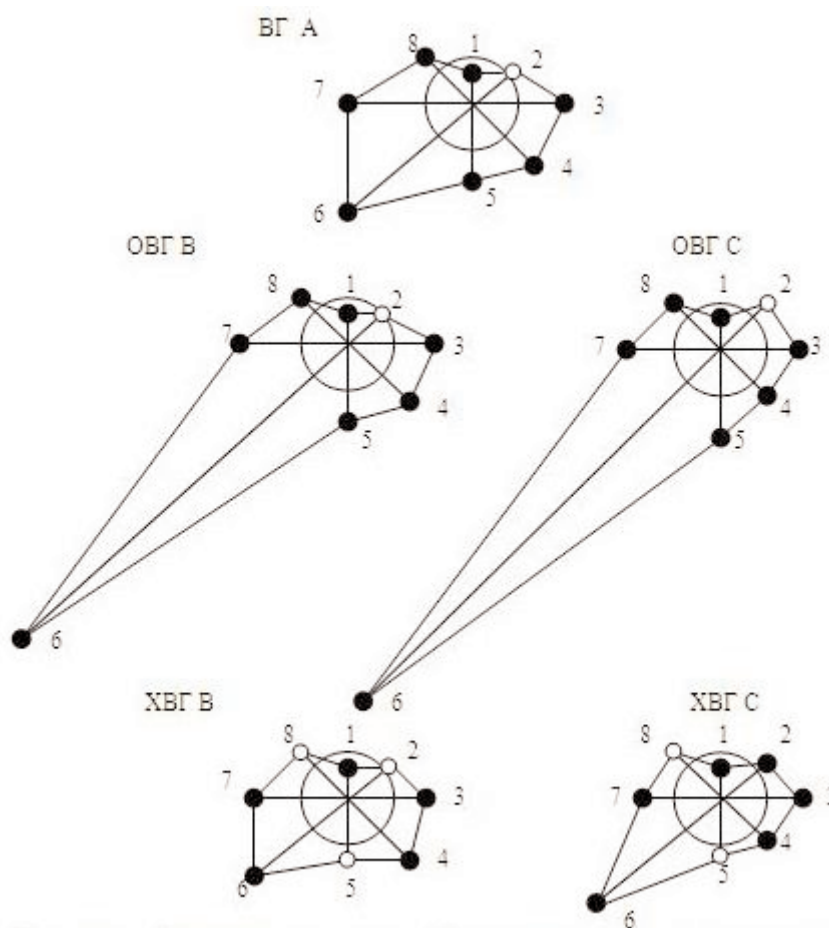
Увеличение в печени активности ГТ, ГПО и ГР при ВГ развивалось параллельно снижению концентрации GSH, то есть изменения уровня GSH и активности ферментов его метаболизма противоположны [4]. Такая же закономерность для ГПО и ГР характерна и для эритроцитов при ВГ. Это может объясняться тем, что более активные ферменты ГТ и/или ГПО расходуют GSH на обезвреживание АФК и ксенобиотиков в большей степени, чем он восстанавливается ГР из окисленной формы GSSG.

Меньшая выраженность ряда показателей системы глутатиона у тяжелых больных по сравнению со среднетяжелым течением – явное проявление характерной для декомпенсации печени билирубин-ферментной диссоциации. Классическое объяснение этого феномена – уменьшение синтеза печеночных ферментов при сильном повреждении гепатоцитов [15]. Для описанной нами реакции системы глутатиона при тяжелом ОБГ целесообразно использовать конкретный термин – билирубин-глутатионовая диссоциация.

Корреляционный анализ показал, что взаимосвязи различных показателей между собой ни разу не были выявлены в контрольной группе (0 из 16 пар) и очень редко встречаются при ВГ (в 3 парах из 90). Ситуация не изменялась и при объединении данных по всем гепатитам. Столь редкие корреляции имели место как между одинаковыми показателями в эритроцитах и плазме, так и между разными показателями в обоих объектах.

Первое подтверждает заключение, что в крови функционируют не одна, а две разные системы глутатиона – в эритроцитах и в плазме [16]. Из этого следует, что определение показателей обмена глутатиона в цельной крови нецелесообразно, их надо исследовать отдельно в эритроцитах и плазме крови. Последнее аргументируется и тем, что изменения в плазме отражают сдвиги не в эритроцитах, а в поражённых клетках. Второе вместе с патогенетически различными сдвигами в эритроцитах и в плазме свидетельствует об отсутствии тесных корреляций между показателями каждой из двух систем, о возможности независимого регулирования их компонентов и, следовательно, о высокой пластичности систем глутатиона.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** При различных ВГ развиваются закономерные сдвиги, показывающие значение системы глутатиона в патогенезе этих болезней и углубляющих понимание происходящих процессов. Комплексное и наглядное изображение этих сдвигов дают рисунки 1-3. Однотипность некоторых изменений при разных и даже при всех исследованных нами заболеваниях показывает наличие в их патогенезе общих механизмов, скорее всего связанных с защитными реакциями на оксидативный стресс, воспалительные процессы и цитолиз.



**Рисунок 1.**

Сдвиги в системе глутатиона крови при ВГ. Обозначения: значения всех показателей в контрольной группе приняты за 100% и изображены в виде радиуса окружности. Изменения у больных (выражены в % к контролю) нарушают симметричность диаграммы – увеличение показателей выражается в виде “лучей”, выступающих за пределы окружности, снижение показателей – в виде впадин. Черные кружки –  $p < 0,05$ , пустые –  $p > 0,05$ . 1-4 – эритроциты, 5-8 – плазма, 1,5 – GSH, 2,6 – ГТ, 3,7 – ГПО, 4,8 – ГР.



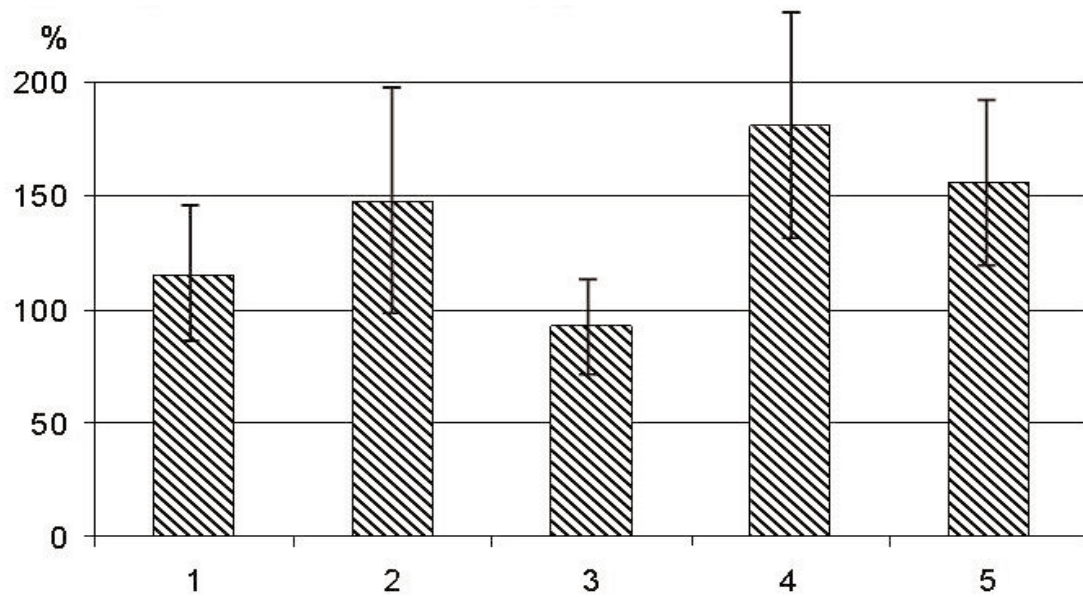


Рисунок 2.

Изменение активности ГГТ в плазме при вирусных гепатитах. Обозначения: 1 – ОВГ А, 2 – ОВГ В, 3 – ХВГ В, 4 – ОВГ С, 5 – ХВГ С. Все сдвиги значимы ( $p < 0,05$ ).

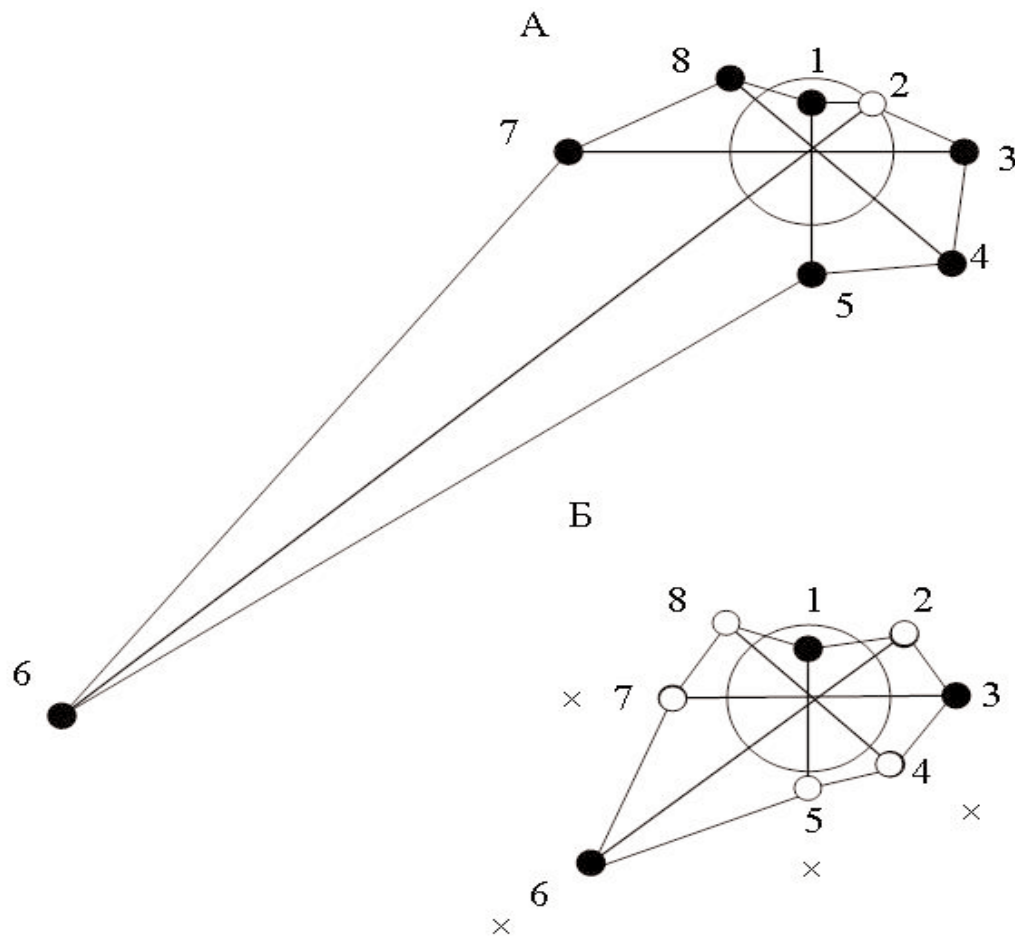


Рисунок 3.

Сдвиги в системе глутатиона крови больных ОВГ В с течением средней тяжести (А) и тяжелым (Б). Обозначения те же, что на рисунке 1; x – значимые различия между А и Б.

Мы выявили и сдвиги, которые представляют интерес для диагностики. В эритроцитах - это снижение концентрации GSH и увеличение активности ГПО только при ВГ; увеличение в плазме крови концентрации GSH и активности ГР только при острых, но не хронических гепатитах; большая выраженность сдвигов в системе глутатиона при средней степени тяжести ОБГ В по сравнению с тяжелой степенью. Хронические заболевания желчного пузыря отличаются от всех ВГ отсутствием снижения GSH и увеличения активности ГПО эритроцитов, наличием снижения активности ГТ эритроцитов; от ХВГ – увеличением GSH плазмы [17]; Эти данные могут быть использованы как дополнение к комплексной диагностике заболеваний гепатобилиарной системы и, возможно, при оценке тяжести ОБГ. Увеличение в плазме крови ГТ не специфично для определенного заболевания печени, но зато высоко чувствительно и связано с остротой и/или тяжестью заболевания. Ряд авторов рекомендовал использование  $\alpha$ -ГТ в диагностике. Мы показали, что информативно определение и суммарной активности ГТ, которое технически намного проще, доступнее и дешевле.

Таким образом, обнаруженные нами сдвиги в системе глутатиона в эритроцитах и плазме расширяют представления о патогенезе изученных заболеваний и могут быть использованы как дополнение к их комплексной диагностике.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Loguercio C., Federico A. (2003) Free Radic. Biol. Med., **34**, 1-10.
2. Stehbens W.E. (2004) Exp. Mol. Pathol., **77**, 121-132.
3. Wen F., Abdalla M.Y., Aloman C., Xiang J., Ahmad I.M., Walewski J., McCormick M.L., Brown K.E., Branch A.D., Spitz D.R., Britigan B.E., Schmidt W.N. (2004) J. Med. Virol., **72**, 230-240.
4. Логинов А.С., Матюшин Б.Н., Ткачев В.Д. (1997) Тер. архив, **69**(2), 25-27.
5. Скулачев В.П. (1998) Биохимия, **63**, 1691-1694.
6. Santangelo F. (2003) Curr. Med. Chem., **10**, 2599-2610.
7. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., Сотникова Г.В., Ковтун В.Ю. (2003) Биохимия, **68**, 656-663.
8. Закс Л. (1976) Статистическое оценивание (перевод с нем.). Статистика, М.
9. Соринсон С.Р. (1998) Вирусные гепатиты, Теза, СПб.
10. Giannini E., Risso D., Ceppa P., Botta F., Chiarbonello B., Fasoli A., Malfatti F., Romagholi P., Lantieri P.B., Testa R. (2000) Clin. Biochem., **33**, 297-301.
11. Liu R.M., Shi M.M., Guilivi C., Forman H.J. (1998) Am. J. Physiol., **274**(3 Pt. 1), 330-336.
12. Lee D.H., Blomhoff R., Jacobs D.R. (2004) Free Radic. Res., **38**, 535-539.
13. Маршалл В.Дж. (1999) Клиническая биохимия (пер. с англ.), Vinom, М., Невский диалект, СПб.
14. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1990) Успехи биол. химии, **31**, 157-179.
15. Зилва Дж.Ф., Пэннелл П.Р. (1988) Клиническая химия в диагностике и лечении (пер. с англ.), Медицина, М.
16. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. (2002) III съезд Росс. биохим. об-ва, тез. науч. докл., СПб, 178.
17. Леонова З.А., Козлова Н.М., Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., Тюрюмин Я.Л. (2002) Сиб. мед. журнал, № 2, 14-15.

Поступила: 25. 03 2005.

GLUTATHIONE SYSTEM IN ERYTHROCYTES AND BLOOD PLASMA  
IN VIRAL HEPATITES

*V.I. Kulinsky, Z.A. Leonova, L.S. Kolesnichenko, I.V. Malov, Yu.A. Danilov*

Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia; fax: (395) 224-0826; e-mail: kulinsky@pp.irkutsk.ru

In all 5 acute (AVHs) and chronic viral hepatitis (CVHs) there was the increase of erythrocyte activities of glutathione peroxidase ( $GP_x$ ) and glutathione reductase (GR), and the decrease in GSH concentration. In blood plasma there was accumulation of  $GP_x$ , glutathione S-transferase (GST) and  $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ GT). GSH and GR increased in plasma only in AVHs. In CVH C erythrocyte GST increased. Evidently changes in the erythrocyte glutathione system are reactions to oxidative stress and in blood plasma they are consequences of inflammation and hepatocyte cytolysis. Changes were more pronounced in middle-heavy course than in the heavy one. These changes have pathogenic importance and can be used in addition to complex diagnostics. They are significantly differed from changes in chronic gall-bladder diseases. Necessity of separate investigation of glutathione system in erythrocytes and blood plasma but not in whole blood is argued.

**Key words:** glutathione system, viral hepatitis.