

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК [616.153.915 + 615.155.32]-07:616.36-0024

©Макаров, Рясенский

### ФОСФОЛИПИДЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ И МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ В И ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

*В.К. Макаров, Д.С. Рясенский\**

Кафедра инфекционных болезней Тверской Государственной  
Медицинской Академии; эл. почта: meddim@nm.ru

Исследовали особенности фосфолипидного состава плазмы крови и мембран лимфоцитов при остром вирусном гепатите В (ОВГ В) и токсическом гепатите (ТГ), связанным с употреблением спиртосодержащих продуктов бытовой химии.

Выявленные особенности фосфолипидного спектра плазмы крови и мембран лимфоцитов являются отражением разнонаправленности изменений биохимических процессов под влиянием вирусной инфекции гепатита В и токсического гепатита. Выявленные изменения фосфолипидного спектра плазматических мембран лимфоцитов связаны с их участием в разрешении иммунопатологических процессов при остром вирусном гепатите В.

**Ключевые слова:** Фосфолипиды, токсический гепатит, вирусный гепатит, лимфоциты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Липидный обмен является одним из сложнейших обменов в организме человека. Содержание различных липидов в тканях и плазме регулируется процессами распада и синтеза, а также реакциями их взаимопревращений [1]. При поражениях печени и изменении ее функции изменяется и соотношение различных липидных фракций в плазме крови [2]. Катаболизм фосфолипидов протекает при участии фосфолипаз. При этом превращение фосфолипидов носит циклический характер, где основными связующими звеньями выступают азотистые основания [3]. Изменения в функциональном состоянии фосфолипаз ведут к возникновению патологического процесса и изменению соотношения отдельных фосфолипидов [4]. Липиды мембран иммунокомпетентных клеток во многом определяют их структурные и функциональные свойства. Многочисленные функции фосфолипидов особенно ярко видны в гепатологии [5]. В литературе есть ряд работ, посвящённых изучению липидного обмена при различных нарушениях функции печени.

Изучение особенностей липидного состава плазмы крови и мембран лимфоцитов при гепатитах вирусной и токсической этиологии имеет важное значения для диагностики и лечения этих заболеваний [6].

Вирусные гепатиты наряду с гепатитами токсической этиологии занимают одно из первых мест в структуре заболеваний печени. Летом и осенью 2006 года значительно участились случаи отравления суррогатами алкоголя. Этиологическим фактором, вызывающим токсический гепатит, в письме Минздравсоцразвития России 5847-РХ от 02.11.06 назван полигексаметиленгуанидина гидрохлорид. Данное вещество относится к 3 классу опасности. К другим потенциальным этиологическим агентам относят диэтилфталат, изопропиловый спирт,

\* - адресат для переписки

ацетальдегид. Доминирующим патогенетическим механизмом токсического гепатита, вызванного отравлением суррогатами алкоголя, является синдром внутриспечёночного холестаза, обусловленного гепатоцеллюлярной и канаккулярной формой интралобулярного холестаза [7].

Целью нашего исследования явилось определение особенностей фосфолипидного состава плазмы крови и мембран лимфоцитов при ОВГ В и ТГ связанным с употреблением спиртосодержащих продуктов бытовой химии.

**МЕТОДИКА.** Исследован фосфолипидный спектр сыворотки крови и мембран лимфоцитов 62 больных токсическим гепатитом (ТГ) и 50 больных острым вирусным гепатитом В (ОВГ В). Больные первой группы находились на стационарном лечении в городах Бежецк и Конаково, больные второй группы - в инфекционном отделении 1 городской больницы г. Твери.

Кровь для исследования (6 мл) забирали из вены шприцом и переносили в заранее подготовленные пробирки с гемоконсервантом – 4% цитратом натрия (1 мл цитрата натрия на 6 мл крови). Далее в каждую пробирку приливали 0,7 мл 4% раствора поливинилового спирта с молекулярной массой 10-12 кДа. Пробирки встряхивали и центрифугировали 5 мин при 200 g. При этом цельная кровь разделялась на 2 слоя [8]. В верхнем слое - лейкоплазме - допустимо содержание единичных эритроцитов.

Для разделения лейкоплазмы на лимфоциты, гранулоциты и плазму использовали метод осаждения клеточных элементов в градиенте плотности. Для приготовления градиента плотности использовали 9% раствор фиколла и 33,9% верографина. В чистую пробирку наливали 2 мл раствора градиента и 2-3 мл лейкоплазмы с примесью единичных эритроцитов. Пробирку центрифугировали 20 мин при 440 g. В результате на дно пробирки оседали гранулоциты и эритроциты, в растворе градиента плотности оставались лимфоциты, а над ними - слой плазмы крови.

Для хроматографического анализа использовали 1 мл плазмы крови и предварительно отмытые в физиологическом растворе лимфоциты.

Анализ проводили с использованием реактивов фирмы “Lachema” и “Реахим” (квалификации х.ч.). Использовали силикагель Lachema П 5/40μ.

К плазме, полученной после разделения крови в градиенте плотности, доливали смесь хлороформ-метанол (1:2 об/об) из расчета 3 мл смеси на 1 мл плазмы. Пробирку встряхивали и герметично закрывали. К лимфоцитам так же добавляли 1 мл хлороформ-метаноловой смеси (1:2). Большое содержание полярного метанола в экстрагирующей смеси определялось необходимостью наиболее полно экстрагировать фосфолипиды клеточных мембран и плазмы крови. Экстракцию проводили в течение суток.

Для очистки от крупнодисперсных примесей экстракты центрифугировали в течении 20 мин при 440 g. Бумажные фильтры не использовали, так как при фильтрации, в связи с испарением экстракта с поверхности фильтра, происходит потеря большого количества липидов, оседающих на фильтре. Далее экстракты отмывали 0,02% раствором хлорида кальция и выпаривали в вакууме при температуре 20-25°C.

Для определения качественного состава фосфолипидов плазмы, а так же клеточных мембран лимфоцитов крови человека, нами был выбран метод одномерной проточной тонкослойной хроматографии в горизонтальных камерах [9]. Хроматографию проводили на силикагелевых пластинках со стеклянной основой длиной 20 см и шириной 4 см. Использовали систему растворителей, состоящую из хлороформа, метанола и аммиака в соотношении 13,4:4,6:1 (об/об/об). Составляющие смеси смешивали непосредственно перед хроматографией. Заполненной камере давали насытиться парами растворителей в течении 10-15 мин. Ток растворителей продолжали в течении 2 часов при температуре окружающей среды 20-25°C, после чего пластинки извлекали и высушивали при температуре 20-25°C в течении 20 минут.

Для проведения идентификации полученных липидных фракций применяли метод цветных реакций, который позволяет установить присутствие конкретных липидных фракций [10].

Для окрашивания хроматографическую пластинку выдерживали в парах концентрированной серной кислоты при температуре 180°C, под действием которой при дальнейшем нагревании происходило обугливание липидов содержащихся в хроматографических зонах.

Через 20 минут хроматографические пластинки извлекали. Процентное отношение фракций фосфолипидов определяли денситометрически с использованием аппаратного денситометра Simadzu CS-9000.

Полученные показатели проверяли на предмет выявления эмпирических функций их распределения и соответствие этих функций нормальной функции распределения (функция Гаусса). Для этой процедуры применялся критерий согласия Шапиро-Уилка, который применим при небольшом количестве измерений. Сравнение групп проводилось двумя способами: для нормально распределённых показателей применялся t-критерий Стьюдента, а в случае аномальности функций распределения – U-критерий Манна-Уитни.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Сравнение относительного содержания фракций фосфолипидов сыворотки крови (табл. 1) показало, что у больных острым вирусным гепатитом В относительное содержание суммарных лизофосфолипидов было ниже чем у здоровых лиц на 6,2% и на 10,3% ниже чем у пациентов с токсическим гепатитом ( $p < 0,001$ ). При токсическом гепатите наблюдался повышенный уровень ЛФЛ по сравнению со здоровыми.

Таблица 1. Фосфолипидный состав сыворотки крови у больных острым вирусным гепатитом В, токсическим гепатитом и здоровых лиц.

Фосфо- липиды	Показатели фосфолипидов в отн. %			p1	p2	p3
	Больные ОВГ В (n = 50)	Больные токсическим гепатитом (n = 62)	Здоровые лица (n = 50)			
ЛФЛ	21,3±0,4	31,6±0,5	27,5±0,6	<0,001	<0,001	<0,001
СМ	24,0±0,6	26,2±0,4	24,3±0,5	<0,01	>0,05	<0,01
ФХ	44,3±1,0	31,1±0,4	36,5±0,8	<0,001	<0,001	<0,001
ФЭ	11,5±0,4	10,9±0,3	10,4±0,5	>0,05	>0,05	>0,05

Примечание: здесь и в табл.2 приведены средние арифметические ± ошибка средних.

p1 - достоверность различий показателей фосфолипидов у больных ОВГ В по отношению к пациентам с токсическим гепатитом;

p2 - достоверность различий показателей фосфолипидов у больных ОВГ В по отношению к здоровым лицам;

p3 - достоверность различий показателей фосфолипидов у токсическим гепатитом по отношению к здоровым лицам.

Уровень сфингомиелина у больных острым вирусным гепатитом В достоверно не отличался от аналогичного показателя у здоровых лиц, но был ниже, чем у пациентов с токсическим гепатитом ( $p < 0,01$ ). Данный показатель у больных токсическим гепатитом был также более высоким по сравнению со здоровыми лицами ( $p < 0,01$ ).

## ФОСФОЛИПИДЫ КРОВИ ПРИ ГЕПАТИТАХ

Относительное содержание фосфатидилхолина (ФХ) было достоверно выше у пациентов с острым вирусным гепатитом В, чем у здоровых лиц и больных с токсическим гепатитом. Напротив, данный показатель при токсическом гепатите оказался ниже, чем у здоровых лиц и значительно ниже соответствующего показателя больных острым вирусным гепатитом В ( $p < 0,001$ ).

По уровню фосфатидилэтаноламина достоверной разницы в изучаемых группах обнаружено не было.

Особенности спектра фосфолипидов сыворотки крови у больных острым вирусным гепатитом В, по сравнению с пациентами с токсическим гепатитом, заключались в более низком относительном содержании суммарных ЛФЛ и СМ и более высоком уровне ФХ, что можно объяснить различным характером нарушений фосфолипидной активности под воздействием токсических веществ и HBV-инфекции.

Сравнение относительного содержания фракций фосфолипидов плазматических мембран лимфоцитов (табл. 2) показало, что у больных острым вирусным гепатитом В относительное содержание суммарных ЛФЛ было в 2 раза выше, чем у пациентов с токсическим гепатитом и в 2,5 раза выше, чем у здоровых лиц ( $p < 0,001$ ).

*Таблица 2.* Спектр фосфолипидов плазматических мембран лимфоцитов у больных острым вирусным гепатитом В, токсическим гепатитом и здоровых лиц.

Фосфо- липиды	Показатели фосфолипидов в отн. %			p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>
	Больные ОВГ В (n = 50)	Больные токсическим гепатитом (n = 62)	Здоровые лица (n = 50)			
ЛФЛ	28,1±0,5	13,2±0,4	11,1±0,3	<0,001	<0,001	<0,001
СМ	21,2±0,4	16,3±0,3	18,6±0,4	<0,01	>0,05	<0,01
ФХ	36,3±0,6	44,6±0,7	48,2±0,9	<0,001	<0,001	<0,001
ФЭ	14,4±0,6	25,4±0,5	20,1±0,3	<0,001	<0,001	>0,05

Уровень СМ у больных острым вирусным гепатитом В был достоверно выше, чем у здоровых лиц и пациентов с токсическим гепатитом ( $p < 0,01$ ). Данный показатель у больных токсическим гепатитом был незначительно ниже по сравнению со здоровыми лицами ( $p < 0,05$ ).

Относительное содержание ФХ, напротив, было наиболее высоким у здоровых лиц, по сравнению с больными острым вирусным гепатитом В и токсическим гепатитом. Больные острым вирусным гепатитом В имели наименьшие значения относительного содержания ФХ в мембранах лимфоцитов.

Мембраны лимфоцитов больных острым вирусным гепатитом В содержали на 5,7% меньше ФЭ, по сравнению со здоровыми лицами, и на 11% меньше чем у пациентов с токсическим гепатитом.

Особенности спектра фосфолипидов плазматических мембран лимфоцитов у больных острым вирусным гепатитом В по сравнению с пациентами с токсическим гепатитом заключались в более высоком относительном содержании

суммарных ЛФЛ и СМ с одной стороны, и более низком уровне ФХ и ФЭ с другой, что можно объяснить иммунопатологическими процессами при остром вирусном гепатите В.

**ВЫВОДЫ.** Выявленные особенности фосфолипидного спектра плазмы крови и мембран лимфоцитов являются отражением разнонаправленности изменений биохимических процессов под влиянием вирусной инфекции гепатита В и токсического гепатита связанного с употреблением спиртосодержащих продуктов бытовой химии.

Выявленные изменения фосфолипидного спектра плазматических мембран лимфоцитов связаны с их участием в разрешении иммунопатологических процессов при остром вирусном гепатите В.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Серебров В.Ю.* (2004) Клин. лабор. диагн., №4, 10-12.
2. *Робине Дж.* (2001) Коррекция липидных нарушений. Основные принципы и практическое осуществление терапевтических вмешательств (пер. с англ.), М.: Медицина.
3. *Kashimoto Y.* (1983) *The Enzymes.*, New York: Academic Press, Vol. **16**. P. 358-407.
4. *Gurr M.I.* (1988) *Proc. Nutc. Soc.*, **47**, 277-285.
5. *Кунц Э., Гундерман К. И., Шнайдер Э.* (1994) Тер. Архив, № 2, 66-72.
6. *Макаров В.К.* (2004) Биомед. химия, **50**, 498-501.
7. *Ивашкин В.Т., Буеверов А.О.* (2007) Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, №1. 4-8.
8. *Каляев В.Д., Сергеев Н.М.* (1970) Вопросы переливания крови и клинической медицины, № 2, 256.
9. *Макаров В.К.* (2006) Вопр. биол., мед. и фарм. химии, №1, 33-35.
10. *Макаров В.К.* (2004) Хроническая HBV-диагностика у лиц, злоупотребляющих алкоголем (особенности диагностики начальной и последующих стадий болезни). Дисс. докт. наук, ВмедА, С.-Петербург.

Поступила: 11. 10. 2008.

## PHOSPHOLIPIDS OF BLOOD AND LYMPHOCYTES MEMBRANES AT A VIRUS HEPATITIS B AND A TOXIC HEPATITIS

*V.K. Makarov, D.S. Ryasenski*

Department of Infectious Diseases, Tver State Medical Academy, Tver, Russia; e-mail: meddim@nm.ru

Phospholipid composition of blood plasma and lymphocyte membranes was investigated in patients with HBV infections and toxic hepatitis associated with the use of surrogate alcohol products.

The revealed changes in phospholipids spectrum of blood plasma and lymphocyte membranes reflect opposite changes in biochemical processes influenced by a virus infection (hepatitis B) and toxic hepatitis.

**Key words:** Phospholipids, a toxic hepatitis, a virus hepatitis, lymphocytes.