

ОЦЕНКА ОСОБЕННОСТЕЙ ВЛИЯНИЯ НАРУШЕНИЙ РЕГУЛИРУЮЩЕЙ РОЛИ ОКСИДА АЗОТА НА ТЕЧЕНИЕ И ПРОГНОЗ ОВГС У ДЕТЕЙ

Даминова М.Н., Халикова Ш.А., Даминова К.М., Абдуллаева О.И., Расулова З.Д.,

Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт, Узбекистан.

✓ Резюме

В статье представлены результаты наблюдения 65 детей, больных с ОВГС, в контрольную группу вошло 20 практически здоровых лиц, идентичного возраста и пола. Возраст больных всех трёх групп колебался от 3 до 14 лет. Диагноз ОВГС и форма тяжести устанавливались по совокупности клинико-эпидемиологических данных, анамнеза, серологического, лабораторного и инструментального исследования. Лабораторные методы исследования включали проведение общего анализа крови, мочи, кала, Анти-НСV определяли методом ИФА с помощью тест систем "Human" (Германия). Специфические серологические диагностические тесты включали определение HBsAg, анти- HBs, анти- HBe, HBeAg, анти- HBe и анти- HDV с помощью радиоиммунного анализа с использованием тест - систем "Радиопрепарат ИЯФ АН РУз" "Abbott", США и наборов ДИА - Plus (Швейцария). Проводилось определение L-аргинина в сыворотке крови. Аминокислотный состав сыворотки крови исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе DuPont (США), на колонке 250/8/4 Nucleosil 5C18 в Институте биоорганической химии АН РУз. Для определения уровня оксида азота сыворотки крови больных ОВГС использовали реактив "Грисса".

Полученные результаты свидетельствуют, что корреляционный анализ позволил смоделировать взаимосвязь больных с ОВГС, с тяжестью заболевания, с его прогнозом. Прогноз и тяжесть заболевания прямо коррелирует с содержанием L- аргинина и NO, увеличение свидетельствует о тяжёлом и вероятном неблагоприятном исходе острого вирусного гепатита С.

Ключевые слова: Оксид азота, острый вирусный гепатит С, дети, L-аргинин, аминокислоты.

ASSESSMENT OF PECULIARITIES OF THE INFLUENCE OF IMPAIRMENTS IN THE REGULATORY ROLE OF NITROGEN OXIDE ON THE CURRENT AND FORECAST OF OVGS IN CHILDREN

Daminova M.N., Khalikova Sh.A., Daminova K.M., Abdullaeva O.I., Rasulova Z.D.,

Tashkent Pediatric Medical Institute, Uzbekistan.

✓ Resume

The article presents the results of observation of 65 children with acute hepatitis C, the control group included 20 practically healthy individuals of identical age and sex. The age of patients in all three groups ranged from 3 to 14 years. The diagnosis of OVGS and the form of severity were established on the basis of a combination of clinical and epidemiological data, anamnesis, serological, laboratory and instrumental studies. Laboratory research methods included general analysis of blood, urine, feces, Anti-HCV was determined by ELISA using the «Human» test systems (Germany). Specific serological diagnostic tests included determination of HBsAg, anti-HBs, anti-HBe, HBeAg, anti-HBe and anti-HDV using radioimmunoassay using the «Radiopreparat INP AN RUz» test systems «Abbott», USA and DIA-Plus kits (Switzerland). Serum L-arginine was determined. The amino acid composition of blood serum was investigated by high performance liquid chromatography on a DuPont chromatograph (USA), on a 250/8/4 Nucleosil 5C18 column at the Institute of Bioorganic Chemistry of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. To determine the level of nitric oxide in the blood serum of patients with OVSH, the «Grissa» reagent was used.

The results obtained indicate that the correlation analysis made it possible to model the relationship of patients with AVHV, with the severity of the disease, and with its prognosis. The prognosis and severity of the disease directly correlates with the content of L-arginine and NO, an increase indicates a severe and likely unfavorable outcome of acute viral hepatitis C.

Key words: Nitric oxide, acute viral hepatitis C, children, L-arginine, amino acids.

BOLALARDA TUG'ILGAN OVG'LARNING VAQTI VA PROGNOSTIKASI UCHUN NITROGEN OKSIDINING REGULYATIV ROLIGA TA'SIR KO'RSATADIGAN TA'SIRNING O'ZIGA XOS XUSUSIYATLARINI BAHOLASH

Daminova M.N., Xoliqova Sh.A., Daminova K.M., Abdullaeva O.I., Rasulova Z.D.,

Toshkent pediatriya tibbiyot instituti, O'zbekiston.

✓ Rezyume

Maqolada O'tkir gepatit C bilan kasallangan 65 bolani kuzatish natijalari keltirilgan, nazorat guruhiga bir xil yosh va jinsdagi 20 ta deyarli sog'lom odamlar kiritilgan. Uchala guruhdagi bemorlarning yoshi 3 yoshdan 14 yoshgacha bo'lgan. OVGs diagnostikasi va og'irlik shakli klinik va epidemiologik ma'lumotlar, anamnez, serologik, laboratoriya va instrumental tadqiqotlar kombinatsiyasi asosida o'rnatildi. Laboratoriya tadqiqot usullari qon, siydik, najasni umumiy tahlilini o'z ichiga olgan, anti-HCV «Inson» test tizimlari yordamida Elishay tomonidan aniqlangan (Germaniya). Maxsus serologik diagnostik testlarga «Abbott», AQSh va DIA-Plus to'plamlari yordamida «Radiopreparation INP AN RUz» test tizimlari yordamida radioimmunoassay yordamida HBsAg, anti-HB, anti-HBe, HBeAg, anti-HDV ni aniqlash kiradi. (Shveytsariya). L-arginin sarumini aniqladilar. Qon zardobining aminokislota tarkibi DuPont xromatografida (AQSh), 250/8/4 Nucleosil 5C18 ustunida, O'zbekiston

Respublikasi Fanlar akademiyasi Bioorganik kimyo institutida yuqori samarali suyuq xromatografiya yordamida tekshirildi. OVSH bilan kasallangan bemorlarning qon zardobidagi azot oksidi miqdorini aniqlash uchun «Grissa» reagenti ishlatilgan.

Olingan natijalar shuni ko'rsatadiki, korrelyatsion tahlil bemorlarning AVHV bilan, kasallikning og'irligi va prognozi bilan munosabatlarini modellashtirishga imkon berdi. Kasallikning prognozi va zo'ravonligi L-arginin va NO tarkibiga bevosita bog'liq, bu o'sish o'tkir virusli gepatit S ning og'ir va ehtimol nojo'ya natijalarini ko'rsatadi. Kalit so'zlar: azot oksidi, o'tkir virusli gepatit C, bolalar, L-arginin, aminokislotalar.

Актуальность

Вирусные гепатиты представляют серьёзную медико-биологическую и социальную проблему человечества. В последние годы в Республике Узбекистан отмечено значительное снижение заболеваемости острыми вирусными гепатитами. Вместе с тем, продолжает формироваться категория больных хроническими вирусными гепатитами, что способствует распространению инфекции. Наибольшую тревогу вызывает инфекция, вызванная вирусом гепатита С [HCV], которая является основной причиной развития хронических заболеваний печени во всём мире [2].

В настоящее время проблема NO и нитросоединений привлекает внимание биологов и медиков самых разных специальностей. Однако исследования последних лет в области сосудистой физиологии, патофизиологии, нейрологии, биохимии, фармакологии, иммунологии показали, что эта высокотоксичная молекула обладает широким спектром биорегуляторного действия в низких и умеренных количествах.

Было установлено, что простейшее химическое соединение - оксид азота (NO) - непрерывно продуцируется ферментативным путем в организме животных и человека, выполняя функции одного из универсальных регуляторов метаболизма. Так, молекула NO обладает высокой биологической активностью благодаря её свободнорадикальной структуре [1]. Оксид азота постоянно образуется в организме млекопитающих из аминокислоты L-аргинина, который под влиянием NO-синтазы (NOS) превращается в NO- и цитрулин [2]. Часть цитрулина, поступающая в печень, преобразуется в мочевины, а другая его часть, поступающая в почки, вновь превращается в L-аргинин [7]. С другой стороны, индукция синтеза NO в гепатоцитах сопровождается сильным ингибированием общего биосинтеза белка. Однако маловероятно, чтобы ингибирование цитохрома P-450 было связано с общим неспецифическим снижением функционирования белков в печени под действием NO. Курран и соавт. [4,6] показали, что гепатоциты синтезируют NO из L-аргинина в количествах, превышающих даже синтез NO активированными клетками иммунной системы и эндотелия или нейтрофилами (2-10 клеток на 1 мл в присутствии супернатанта купферовских клеток, активированных ЛПС, синтезируют до 0,74 ммоль нитрата/нитрита за 18 ч.). Эти данные свидетельствуют о том, что количества NO, продуцируемые *in vivo*, достаточны для ингибирования цитохрома P-450, т.е. NO способен регулировать активность P-450 *in vivo*. Цитохром P-450 локализован в печени, надпочечниках, почках, желудке, тонком кишечнике, коже, легких и др. [1,3]. Продукты метаболизма NO, снижая содержание этого гемопротеида в печени и других органах, блокируют метаболизм многих соединений. Ингибирование биосинтеза NO приводит к повреждениям печени [5]. Важным свойством NO, NO₂- и NO₃- является их высокая реакционная способность по отношению к ферментам изменять их метаболическую

активность. Доказано, что при ряде терминальных состояний, при острых воспалительных процессах, наблюдается значительное повышение уровня NO в крови. При этом активированные в гепатоцитах синтазы оксида азота увеличивают его продукцию. Высокие концентрации NO оказывают прямое цитотоксическое и иммуногенное действие, соединяясь с супероксидом и образуя пероксинитрит, который индуцирует повреждение ДНК и мутацию, ингибирует функцию ферментов. Как показал анализ литературы последних лет, в гепатоцитах наиболее интенсивно образуется NO - нитрооксидсинтаза (NOS), в ответ на стимуляцию цитотоксинами: гамма-интерфероном, интерлейкинами, фактором некроза опухоли, бактериальными и вирусными липополисахаридами [5,7].

Все вышеизложенное свидетельствует об особенностях метаболизма ткани печени. Наблюдаемое нами увеличение уровня глутамата, видимо, связано уменьшением его использования в ноцеппии. Вместе с тем, глутамат является субстратом для образования транспортной формы NH₄⁺. С другой стороны, при участии глутамата в ткани печени идут процессы трансдезаминирования аминокислот, что, видимо, определяет его высокое содержание в ткани печени. Следует сказать, что более низкие значения аргинина в ткани печени могут привести к замедлению и уменьшению образования оксида азота для глутаматэргических реакций печени.

Цель исследования. Изучить особенности влияния нарушений регулирующей роли оксида азота на течение и прогноз ОВГС у детей.

Материал и методы

Проведено клиническое обследование 65 детей, больных с ОВГС, в контрольную группу вошло 20 практически здоровых лиц, идентичного возраста и пола. Возраст больных всех трёх групп колебался от 3 до 14 лет. Диагноз ОВГС и форма тяжести устанавливались по совокупности клинико - эпидемиологических данных, анамнеза, серологического, лабораторного и инструментального исследования. Анти-HCV определяли методом ИФА с помощью тест систем "Human" (Германия). Специфические серологические диагностические тесты включали определение HBsAg, анти- HBs, анти - HBe, HBeAg, анти - HBe и анти - HDV с помощью радиоиммунного анализа с использованием тест - систем "Радиопрепарат ИЯФ АН РУз" "Abbott", США и наборов ДИА - Plus (Швейцария). Проводилось определение L-аргинина в сыворотке крови. Аминокислотный состав сыворотки крови исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе DuPont (США), на колонке 250/8/4 Nucleosil 5C18 [222] в Институте биорганической химии АН РУз. Для определения уровня оксида азота сыворотки крови больных ОВГС использовали реактив "Грисса". Результаты анализов сравнивали с данными контрольной группы, которую составили 20 здоровых детей.

Результат и обсуждение

Проведен анализ содержания аминокислот у больных с ОВГС, по полученным результатам исследования отмечалась заметная диспропорция содержания аминокислот; повышение одних и резкое снижение других с весьма медленным выравниванием нарушенных соотношений. Наибольшие изменения отмечались при тяжёлой форме в разгар болезни, по сравнению с легкой и среднетяжёлой формами. Диспропорция содержания аминокислот зависела от тяжести заболевания. По полученным данным, при тяжёлом течении ОВГС содержание аминокислот всегда высокое. По мере ухудшения общего состояния, нарастания симптомов интоксикации, желтухи и сокращения размеров печени и селезенки, ухудшения функциональных проб, содержание аминокислот быстро нарастало. Количество таких аминокислот, как аргинин, триптофан, лейцин, фенилаланин, гистидин, глутамат, изолейцин, - во много раз (в 10-40) превышает норму [4,6].

По полученным результатам исследования, в сыворотке крови ОВГС у детей уменьшается содержание протромбина и сложных белковых комплексов с одновременным увеличением содержания почти всех аминокислот, и прежде всего триптофана, гистидина, фенилаланина, цистина и лизина, а при тяжёлом течении ОВГС - аргинина и глутамина.

Средний уровень аминокислот повышался в 1,5-2 раза по сравнению с нормой в начальный период и разгар болезни. У всех наблюдавшихся нами больных сроки нормализации выявленных нами нарушений обмена аминокислот зависели от тяжести поражения печени и характера течения заболевания, однако и к периоду реконвалесценции их уровень часто оставался повышенным. В периоде ранней реконвалесценции общее содержание аминокислот при легких формах составляло 27,55 мг%, а при среднетяжёлых - 38,57 мг%. Оставалось повышенным содержание аргинина, гистидина, триптофана, фенилаланина. Увеличение количества аргинина в сыворотке крови свидетельствует об увеличении синтеза оксида азота в гепатоцитах печени больных. При ХВГС степень повышения активности аргинина отражает тяжесть поражения печеночных клеток.

Проведенные исследования показали, что содержание конечных продуктов оксида азота (мкмоль/л) в сыворотке крови контрольной группы составляет $(0,9089 \pm 0,0012)$ мкмоль/л. Содержание конечных продуктов оксида азота (мкмоль/л) в сыворотке крови у больных с ОВГС при легкой форме характеризуются повышением в сыворотке крови до $(1,289 \pm 0,06)$ мкмоль/л ($P < 0,001$); при средне-тяжёлой форме - до $(1,820 \pm 0,09)$ мкмоль/л ($P < 0,001$) и при тяжёлой форме ОВГС составляют $(2,623 \pm 0,13)$ мкмоль/л ($P < 0,001$).

Как видно из представленного материала, в сыворотке крови наблюдается заметное увеличение уровня конечных продуктов оксида азота при ОВГС у детей. Эти результаты согласуются с данными уровня аргинина. У больных с легкой формой заболевания активность аргинина была увеличена до $801,7 \pm 20,0$ нмоль/л; у больных со средне-тяжёлой формой - до $1053,1 \pm 26,01$ нмоль/л и с тяжёлой формой - до $1601,2 \pm 40,0$ нмоль/л, у здоровых - $567,46 \pm 2,44$ нмоль/л в сыворотке крови, что свидетельствует об увеличении синтеза оксида азота в гепатоцитах печени больных детей.

Наращение конечных продуктов оксида азота в организме больных с ОВГС является важным фактором в механизмах повреждения монооксигеназной системы. Чтобы доказать это нами проведены исследования по изучению корреляционной связи между показателями NO и биохимическими показателями крови больных с ОВГС в острый период заболевания. Установлена чёткая зависимость между нарушениями в обмене NO, результатами аминокислотного анализа и такими показателями как АсАТ, АлАТ, ЩФ, показателями билирубина, протромбинового индекса.

Проведен математический анализ взаимосвязей между результатами аминокислотного анализа, а также NO в сыворотке крови и показателями билирубина, АлАТ, АсАТ, тимоловой пробы, сулемовой пробы и протромбинового индекса при ОВГС в зависимости от степени тяжести. Были определены средние статистические значения признаков, критерии t-Стьюдента и составлены корреляционные пары. С помощью корреляционного анализа выявлен ряд связей между аминокислотами, NO, и биохимическими показателями, характеризующих острый вирусный гепатит в зависимости от степени тяжести течения заболевания. Прямая тесная связь выявлена при ОВГС у больных с легкой формой заболевания между содержанием NO и следующих аминокислот сыворотки крови: тирозин ($r = +0,495$), гистидин ($r = +0,432$), аргинин ($r = +0,379$), валин ($r = +0,370$), лейцин ($r = +0,272$), изолейцин ($r = +0,261$), пролин ($r = +0,202$), метионин ($r = +0,129$), аланин ($r = +0,69$), аспартат ($r = +0,074$), цистеин ($r = +0,046$). При анализе результатов NO и аминокислотного анализа сыворотки крови больных со средне-тяжёлой формой ОВГС выявлена прямая высокая корреляция с: гистидином ($r = +0,355$), аспартатом ($r = +0,001$), цистеином ($r = +0,257$), валином ($r = +0,141$), изолейцином ($r = +0,175$), аргинином ($r = +0,019$), триптофаном ($r = +0,099$), пролином ($r = +0,087$), метионином ($r = +0,021$), глицином ($r = +0,032$). Прямая тесная связь выявлена у больных с ОВГС при тяжёлой форме заболевания NO со следующими аминокислотами сыворотки крови: изолейцин ($r = +0,461$), глицин ($r = +0,431$), валин ($r = +0,309$), аргинин ($r = +0,297$), метионин ($r = +0,205$), лейцин ($r = +0,160$), аланин ($r = +0,059$).

При анализе результатов наших исследований NO и аминокислотного анализа у больных детей с ОВГС выявлена прямая высокая корреляция со следующими аминокислотами в сыворотке крови: аргинин, гистидин, валин, изолейцин, лейцин, триптофан, глицин, метионин. При анализе результатов наших исследований NO и биохимических показателей крови у больных детей с ОВГС прямая высокая корреляция выявлена при средне-тяжёлой форме со следующими биохимическими показателями крови: Билирубин ($r = +0,034$), тимоловая пр. ($r = +0,13$), сулемовая пр. ($r = +0,05$), ПТИ ($r = +0,09$); при тяжёлой форме со следующими биохимическими показателями крови: Билирубин ($r = +0,30$), АлАТ ($r = +0,14$), АсАТ ($r = +0,18$), тимоловая пр. ($r = +0,23$), ПТИ ($r = +0,16$).

Результат и обсуждения

Таким образом, корреляционный анализ позволил смоделировать взаимосвязь больных с ОВГС с тяжестью заболевания, с его прогнозом. Прогноз и тя-

жесть заболевания прямо коррелируют с содержанием L-аргинина и NO, увеличение свидетельствует о тяжелом и вероятном неблагоприятном исходе ОВГС. При анализе результатов наших исследований, у больных с ОВГС наблюдаются существенные различия в аминокислотном спектре сыворотки крови в зависимости от степени тяжести, связанные как с особенностями метаболизма ткани печени, так и с развившейся патологией. В сыворотке крови выявлено заметное увеличение уровня аргинина. Эти изменения в определенной степени совпадают с уровнем конечных продуктов оксида азота. По сравнению с показателями контрольной группы, у больных с ОВГС содержание их в сыворотке крови возрастает в зависимости от степени тяжести. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении выработки оксида азота гепатоцитами печени больных с ОВГС.

Результаты исследования показали, что в сыворотке крови у детей ОВГС, по сравнению с данными в контроле, отмечается достоверное увеличение содержания продуктов NO, NO₂- и NO₃-. Так, уровень конечных продуктов оксида азота в сыворотке крови у больных с ОВГС превышал данные у здоровых детей на 40,7%. Анализ результатов исследования показал, что у больных с ОВГС острый период заболевания протекает с явлениями нарушения обмена NO. При этом выявлено неблагоприятное влияние нарастания продуктов метаболизма NO на течение заболевания ОВГС у детей, на что указывает четкая корреляционная взаимосвязь показателей, характеризующих метаболизм NO и процессы цитолиза, холестаза.

Таким образом, корреляционный анализ позволил смоделировать взаимосвязь больных с ОВГС, с тяжестью заболевания, с его прогнозом. Прогноз и тяжесть заболевания прямо коррелирует с содержанием L- аргинина и NO, увеличение свидетельствует о тяжелом и вероятном неблагоприятном исходе острого вирусного гепатита С.

Следовательно, у больных с ОВГС наблюдаются существенные изменения в аминокислотном спектре сыворотки крови, связанные как с особенностями метаболизма ткани печени, так и с развившейся патологией. В сыворотке крови отмечена тенденция к увеличению уровня аргинина. Эти изменения в определенной степени совпадают с уровнем конечных продуктов оксида азота. По сравнению с показателями контрольной группы, у больных с ОВГС содержание их возрастает. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении выработки оксида азота гепатоцитами печени больных с ОВГС. Установлен факт того, что при ОВГС продуцирование NO гепатоцитами, экспрессия iNOS в гепатоцитах оказывает гепатопротекторное влияние на печень. Продуцируемая в резуль-

тате активации iNOS NO в гепатоцитах способствует снижению воспалительного процесса при остром вирусном гепатите С у детей.

Выводы

" Установлено, что корреляционный анализ позволил смоделировать взаимосвязь у больных ОВГС между тяжестью заболевания и содержанием L-аргинина и конечных продуктов оксида азота ($2,623 \pm 0,13$ мкмоль/мл). Тяжесть состояния больных соответствует уровню повышения NO, а увеличение уровня аргинина ОВГС ($1601,2 \pm 40,0$ нмоль/мл) и ХВГС ($1153,2 \pm 28,36$ нмоль/мл) говорит об увеличении выработки конечных продуктов оксида азота гепатоцитами печени.

" Установлено, что ОВГС у детей сопровождается достоверно высоким уровнем содержания конечных продуктов оксида азота ($2,623 \pm 0,13$ мкмоль/мл) в сыворотке крови, что указывает на нарушение метаболизма оксида азота (NO).

" Высокий уровень содержания конечных продуктов оксида азота (NO) ($1,289 \pm 0,06$ мкмоль/мл; $1,820 \pm 0,09$ мкмоль/мл; $2,623 \pm 0,13$ мкмоль/мл) при ОВГС отражает тяжесть течения и говорит о предрасположенности больных к хронизации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Антиоксидантная система организма /Т.С.Соатов, У.К.Ибрагимов, З.Р.Хайбулина, и др. //Мед.журнал Узбекистана. - 2016. - № 3. - С. 107-113.
2. Виноградов Н.А. Синтез окиси азота в организме больных вирусными гепатитами. Антибиотики и химиотерап. 2011; 6 (4): 26-28.
3. Даминова М.Н., Закирходжаев А.К., Халикова Ш.А. Определение уровня аминокислот сыворотки крови у больных с ОВГС. //Журн. Инфекция, иммунитет и фармакология. - Ташкент, 2015. - № 2. - С. 121-123.
4. Лебедев В.В., Бондаренко И.Н., Авдеева М.Г. и др. Клиническое значение уровня оксида азота в дифференциальной диагностике острых, хронических вирусных и токсических поражений печени.//Инфекц. болезни. 2010; 8 (1): 19-24.
5. Тейлор Б.С., Аларсон Л.Х., Биллиар Т.Г. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функция. Биохимия. 2008;7: 903-923.
6. Халикова Ш.А., Даминова М.Н., Закирходжаев А.К. Значение L-аргинина - NO-системы при остром вирусном гепатите С. // "Болезни печени в практике клинициста": Тез. докл. научно-практической конференции с международным участием. - Харьков, 1-2 марта, 2017. - С.299-301.
7. Shchekotova A.P., Bulatova I.A., Mutagarov I.N. Nitric oxide - test of the chronic hepatitis and cirrhosis differential diagnosis. Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy. 2012; (3): 39-41.

Поступила 09.09.2020