

## ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТАХ В, С

А.О. Михайлов, А.Ф. Попов, Н.С. Иванова, А.И. Симакова

Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

### Dna damage in lymphocytes in chronic viral hepatitis B, C

A.O. Mikhailov, A.F. Popov, N.S. Ivanova, A.I. Simakova  
Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

#### Резюме

**Цель.** Установить степень повреждения ДНК лимфоцитов и определить уровень содержания 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-OHdG) и 8-нитрогуанина (8-NO<sub>2</sub>G), общей антиоксидантной активности (ОАА) в сыворотке крови больных хроническими вирусными гепатитами С (ХВГС), В (ХВГВ).

**Материалы и методы.** В исследовании приняли участие 100 человек с ХВГС, 50 с ХВГВ и 43 добровольца. Повреждения ДНК оценивали методом ДНК-комет. Уровень 8-NO<sub>2</sub>G и 8-OHdG определяли в образцах сыворотки крови с помощью наборов для ИФА. ОАА определяли по стандартной методике с АВТС. Статистическую обработку проводили с использованием пакета STATISTICA 10.0.

**Результаты.** Отмечалась тенденция к увеличению уровня повреждений ДНК с прогрессированием стадии фиброза печени при ХВГВ и ХВГС. Обнаружены значимые отличия от показателя нормы 8-NO<sub>2</sub>G в группах F1, F2, F3 при ХВГС и в группах F2, F3, F4 ( $p < 0,05$ ) при ХВГВ. Во всех группах при ХВГС и в F2 и F4 при ХВГВ уровень 8-OHdG выше по сравнению с образцами контрольной группы ( $p = 0,0001$ ). Показаны корреляции между стадией фиброза печени и уровнем 8-NO<sub>2</sub>G и 8-OHdG соответственно ( $r = 0,786620$  и  $r = 0,625844$ ;  $p < 0,05$ ) при ХВГС и ХВГВ ( $r = 0,573933$  и  $r = 0,478849$ ;  $p < 0,05$ ). При исследовании ОАА у пациентов отмечалась тенденция к её истощению с развитием фибротических изменений, однако достоверные различия в сравнении с контролем были только на стадии фиброза F3 и F4 при ХВГС и F2, F4 ( $p < 0,05$ ) при ХВГВ.

**Заключение.** Выявлен генотоксический эффект влияния вирусов гепатита В и С на ДНК лимфоцитов. Отмечено увеличение степени фрагментации ДНК с прогрессированием фиброза печени. Выявлена корреляция между стадией фиброза и биохимическими маркерами повреждения ДНК, а также показано декомпенсаторное снижение ОАА сыворотки на продвинутых стадиях фиброза печени.

**Ключевые слова:** гепатит, цирроз, повреждения ДНК, метод ДНК-комет, окислительный стресс.

#### Введение

За последнее десятилетие количество работ, посвященных изучению окислительного стресса

#### Abstract

**Objective:** determine grade of DNA damage in lymphocytes and the levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) and 8-nitroguanine (8-NO<sub>2</sub>G), total antioxidant activity (TAA) in the blood serum of patients with chronic viral hepatitis C (HCV), B (HBV).

**Materials and methods.** The study included 100 people with HCV, 50 with HBV and 43 volunteers. DNA damage was evaluated by comet assay. Level 8-NO<sub>2</sub>G and 8-OHdG were determined in serum samples using ELISA kits. TAA determined according to the standard ABTS method. All statistical calculations were performed and the graphs were plotted using STATISTICA 10.0 software.

**Results.** There was a tendency to increase the level of DNA damage with progression of the liver fibrosis stage in HCV and HBV. Significant differences from the norm of 8-NO<sub>2</sub>G in the F1, F2, F3 groups with HCV and in the groups F2, F3, F4 ( $p < 0,05$ ) with HBV were found. In the groups with HCV and in F2 and F4 with HBV, the level of 8-OHdG is higher in comparison with the control group ( $p = 0,0001$ ). Correlations are shown between the stage of hepatic fibrosis and the level of 8-NO<sub>2</sub>G and 8-OHdG, respectively ( $r = 0,786620$  and  $r = 0,625844$ ;  $p < 0,05$ ) with CVHC and CVHB ( $r = 0,573933$  and  $r = 0,478849$ ;  $p < 0,05$ ). In the study of OAA, the tendency towards its depletion with the development of fibrotic changes was noted in patients, however, significant differences in comparison with the control were only at the stage of F3 and F4 fibrosis in CVHC, and F2, F4 ( $p < 0,05$ ) with CHBV.

**Conclusion.** Revealed the genotoxic effect of hepatitis B and C on the DNA of lymphocytes. An increasing degree of DNA fragmentation with the progression of liver fibrosis. The correlation between fibrosis and biochemical markers of DNA damage and decrease shown decompensated TAA serum in advanced stages of liver fibrosis.

**Key words:** hepatitis, cirrhosis, DNA damage, comet assay, oxidative stress.

при вирусном гепатите, увеличилось многократно, преимущественно по пероксидному окислению липидов, что позволило сделать это направ-

ление одним из ведущих в изучении патогенеза любого заболевания [6, 7]. Однако роль пероксидного окисления белков, нуклеиновых кислот, а также вопросы, связанные с нитрооксидэргическими механизмами формирования поврежденных функционально-активных молекул, недооценены [8]. В связи с этим в последнее время исследователями стало уделяться больше внимания механизмам эпигенетических изменений в ДНК и их влиянию на течение фиброгенеза при хронических вирусных гепатитах и трансформацию в гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) [12]. К настоящему времени до конца не определена зависимость между степенью деструкции ДНК гепатоцитов, лимфоцитов в группах пациентов с ГЦК и без нее. Также остается нерешенным вопрос о разнице между пациентами с циррозом печени в исходе хронических вирусных гепатитов и с ГЦК [2, 13]. Исследования в этой области могут решить важную проблему – выделение специфических биохимических маркеров-предикторов злокачественной трансформации.

С другой стороны, важной остается и оценка непосредственной генотоксичности вирусов гепатита В и С. В этом направлении разрабатываются теории апоптоза, что является важным фактором в патогенезе вирусных гепатитов [9, 13]. Однако работ, в которых оценивались бы количественные характеристики степени деструкции ДНК клеток при гепатите, не так много.

**Цель исследования** – установить степень повреждения ДНК лимфоцитов и определить уровень содержания маркеров повреждения ДНК: 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и 8-нитрогуанина, общей антиоксидантной активности в сыворотке крови больных хроническими вирусными гепатитами В и С.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.

## Материалы и методы

В исследовании приняли участие пациенты инфекционного отделения Краевой клинической больницы № 2 и Краевой клинической инфекционной больницы – 150 человек за период 2012–2016 гг. Критериями включения пациентов в исследование были наличие подтвержденного методом ИФА гепатита В, С с давностью заболевания более 6 месяцев, идентифицированной методом ПЦР ДНК вируса гепатита В (HBV), РНК вируса гепатита С (HCV) с чувствительностью не менее 20 МЕ/мл. Степень выраженности фиброза печени определяли на аппарате FibroScan по классификации METAVIR. Биохимическую активность при гепатите устанавливали на основании лабораторных синдромов мезенхимального воспаления, цитолиза, холестаза. Критериями исключения служили: признаки хронической артериальной недостаточности, ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность, сахарный диабет, другие инфекционные и сопутствующие заболевания внутренних органов в стадии обострения, беременность, психические расстройства. Все больные получали стандартную патогенетическую терапию ХВГВ, ХВГС.

В контрольную группу включены 43 добровольца без сопутствующих аутоиммунных, острых и хронических заболеваний органов кровообращения, почек, поджелудочной железы, печени, сопоставимые по полу и возрасту с пациентами основной группой. В крови добровольцев маркеры вирусных гепатитов и ВИЧ были неопределяемыми.

Возраст больных колебался от 25 до 60 лет, средний возраст составил  $39,7 \pm 12,3$ ; количество мужчин – 81, женщин – 69. Все исследуемые были разделены на 5 групп по две подгруппы в каждой – С (больные ХВГС) и В (больные ХВГВ): F0 – пациенты со степенью фиброза F0 ( $n = 29$ ), F1 – пациенты со степенью фиброза F1 ( $n = 31$ ), F2 – пациенты со степенью фиброза F2 ( $n = 30$ ), F3 – пациенты со степенью фиброза F3 ( $n = 27$ ), F4 – пациенты со степенью фиброза F4 ( $n = 33$ ) и контрольную группу ( $n = 43$ ) (табл. 1).

Таблица 1

Половозрастная характеристика исследуемого контингента

Показатель	Группа										Контроль
	F0		F1		F2		F3		F4		
	С	В	С	В	С	В	С	В	С	В	
Количество человек	19	10	21	10	20	10	17	10	23	10	43
Средний возраст	$48 \pm 17$	$31 \pm 12,7$	$47 \pm 14$	$37 \pm 11,8$	$43 \pm 15$	$38,7 \pm 15,3$	$38 \pm 12$	$36,3 \pm 10,8$	$47 \pm 12$	$35,5 \pm 12$	$39 \pm 12$
Количество мужчин/женщин в группе	9/10	5/5	10/11	7/3	12/8	8/2	10/7	4/6	11/12	5/5	25/18

Исследование проб крови проводили однократно – при поступлении у пациентов забирали 2 мл цельной крови в пробирки, содержащие антикоагулянт. Выделение лимфоцитов проводили поэтапным методом с использованием градиента фиколл-урографина ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ) в стерильных условиях. Цельную кровь, разведенную питательной средой 199 (1:2), наслаивали на раствор фиколл-урографина и центрифугировали при комнатной температуре в центрифуге с горизонтальным ротором при 2000 об/мин в течение 30 мин. Выделенные клетки трижды отмывали средой 199, центрифугируя по 10 мин при 1000 об/мин.

Оценку степени повреждения ДНК проводили методом ДНК-комет в щелочной среде (P. Olive) [3, 11]. Отмытые лимфоциты (50 мкл) смешивали с 500 мкл 1% раствора легкоплавкой агарозы («Sigma»), приготовленной на фосфатно-солевом буфере при температуре 37° С до финальной концентрации  $10^4$  клеток/мл. Затем 60 мкл клеточной суспензии наносили на слайды, предварительно покрытые нормоплавкой агарозой («Sigma»), и накрывали покровными стёклами. Слайды для застывания агарозы хранили 5 мин при температуре 4° С. После затвердевания агарозы снимали покровные стекла и помещали препараты в холодный (4°С) лизирующий буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 10,0, 2,5 мМ NaCl, 100 мМ EDTA-Na<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 10% ДМСО) на 1 ч при 4°С. По окончании лизиса препараты помещали в камеру для электрофореза, содержащую щелочной буфер (300 мМ NaOH, 1мМ EDTA-Na<sub>2</sub>), на 40 мин. Далее проводили электрофорез при напряжении 20 В и силе тока 300 мА в течение 25 мин. Слайды после электрофореза трижды по 5 мин обрабатывали 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 флюоресцентном микроскопе Zeiss при увеличении в 200 раз. Полученные изображения анализировали с помощью программы Comet Score. Анализ подвергались не менее 100 клеток каждого препарата. Данная модификация метода позволяет оценить количество одно- и двунитевых разрывов ДНК ядродержащих клеток. Используя её, представляется возможным классифицировать и визуально подсчитать клетки, погибшие путём апоптоза и некроза.

Для оценки степени повреждения ДНК использовали показатель содержания ДНК в хвосте комет (% DNA t%), так же регистрировали количество комет с повреждениями ДНК более 50%, известные в литературе под названием «апоптотические ДНК-кометы». Некротические клетки определяли как широкие рыхлодиффузные ДНК-кометы неправильной формы.

Определение уровня 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-OHdG) проводили в образцах сыворотки крови с помощью коммерческого набора для ИФА (Highly Sensitive 8-OHdG Check ELISA; Fukuroi, Shizuoka, Japan) согласно инструкции производителя.

Определение уровня 8-нитрогуанина (8-NO<sub>2</sub>G) проводили в образцах сыворотки крови с помощью коммерческого набора для ИФА (OxiSelect™ Nitrosative DNA/RNA Damage ELISA Kit (8-Nitroguanine Quantitation); CELL BIOLABS, INC.) согласно инструкции производителя.

Для определения уровня общей антиоксидантной активности (ОАА) в предварительно нагретую и заполненную фосфатным буфером (0,1М; pH=7,0; 37 °С) кварцевую кювету вносили 90 мкл раствора, содержащего 5 ммоль 2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоната (ABTS, «Sigma») и 10 мкл исследуемого образца [4]. После этого в кювету быстро добавляли 300 мкл раствора, содержащего 200 ммоль 2,2'-азо-бис(2-амидинпропана) (АВАР) 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  $\pm 10$  (lag-time) в режиме абсорбции при длине волны 414 нм. Результаты выражали в перерасчете на единицы общей антиоксидантной активности (ОАА), идентичные параметрам для тролокса, в ммоль/л.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета STATISTICA 6.4, Microsoft Office Excel 2007. Проверку нормальности распределения количественных параметров проводили с помощью критериев Колмогорова – Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро – Уилка. Описание совокупности и разработка референтных интервалов уровня поврежденности ДНК мононуклеарных клеток крови проводились методом персентилей, с использованием показателей медианы (P50), верхних и нижних децилей (P10 и P90), квартилей (P25 и P75), минимума (P0) и максимума (P100). За верхнюю границу нормы изучаемого признака взят показатель P75. Для сравнения количественных показателей групп между собой использовали метод Тьюки для неравных групп и критерий Ньюмана – Кеулса. В исследовании результаты считались значимыми при  $p < 0,05$ .

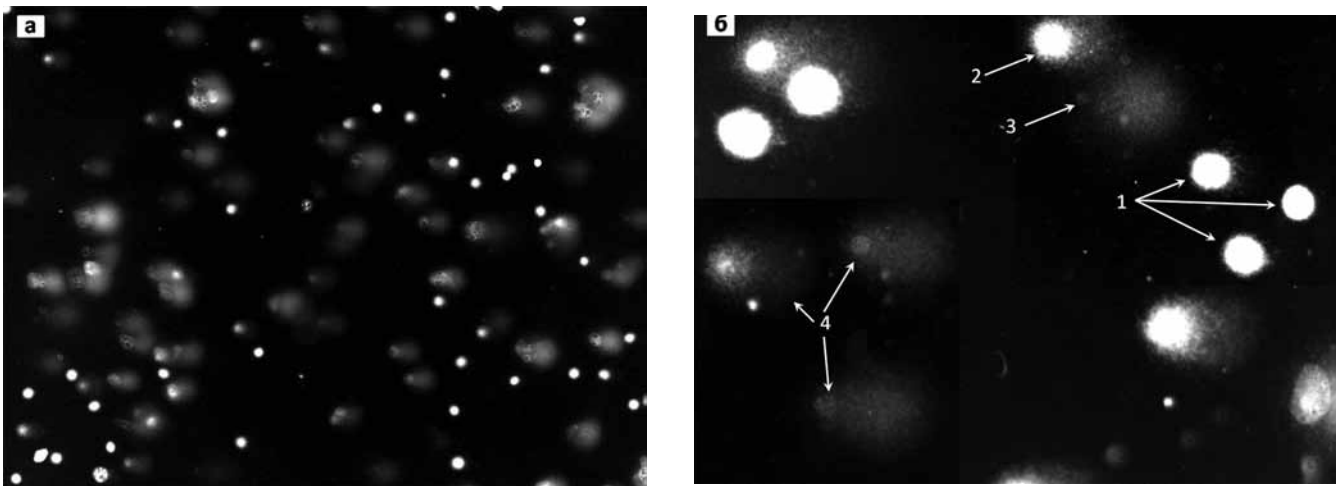
### Результаты и обсуждение

Во всех исследуемых группах пациентов были зафиксированы отличные от контрольной группы показатели % ДНК в хвосте комет (табл. 2). Так, отмечается тенденция к увеличению уровня повреждений с прогрессированием стадии фиброза печени от  $5,1 \pm 1,34$  на стадии F0 до  $14,49 \pm 1,63$  на стадии F4 при ХВГВ, при ХВГС – от  $12,66 \pm 4,53$  на стадии F0 до  $24,41 \pm 9,02$  на стадии F4 (рис. 1).

Характеристика повреждений ДНК лимфоцитов

Группа		% ДНК в хвосте (Median [Q25%;Q75%])	% апоптотических клеток	% некротических клеток
Здоровые		3,75±1,44 [2,69; 4,48]	0	0
F0	B	5,1±1,34 [4,56; 6,24]	0	0
	C	12,66±4,53 [10,83; 15,44]***	0,8	0
F1	B	7,39±0,79 [6,32; 7,67]	0	0
	C	13,13±5,17 [10,54; 17,73]***	1	0
F2	B	8,1±2,21 [7,94;10,49]*	0	0
	C	20,52±7,31 [14,07; 25,44]***	1	0
F3	B	14,68±1,99 [14,31; 15,48]**	1	0
	C	20,63±10,19 [16,81; 31,16]***	3	0
F4	B	14,49±1,63 [13,14; 16,04]**	0,88	0
	C	24,41±9,02 [12,81; 30,81]***	5	0

\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .



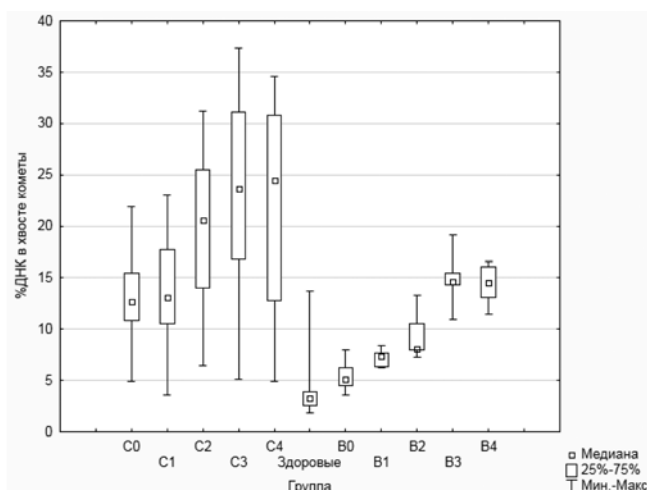
**Рис. 1.** Микрофотографии ДНК комет: а – популяция ДНК-комет у пациентов на продвинутой стадии фиброза печени F4, окраска – этидий бромид, ув.  $\times 50$ ; б – ДНК кометы: 1 – здоровые клетки, 2 – повреждения средней силы (20 – 30%), 3 – апоптотическая клетка, 4 – выраженные повреждения (30 – 50%), окраска – этидий бромид, ув.  $\times 100$

Отличия между пациентами с ХВГС И ХВГВ характеризуются (см. табл. 2), во-первых, тем, что при гепатите С изначально даже при отсутствии фибротических изменений уровень повреждений ДНК лимфоцитов выше, чем в аналогичной группе ( $p = 0,004$ ) и на стадии фиброза F1 ( $p = 0,03$ ) при гепатите В (рис. 2). Также отмечено достоверное различие внутригрупповых показателей на стадиях фиброза F0 ( $p = 0,004$ ), F1 ( $p = 0,001$ ), F2 ( $p = 0,00006$ ), F3 ( $p = 0,001$ ), F4 ( $p = 0,001$ ) при сравнении больных ХВГВ и ХВГС.

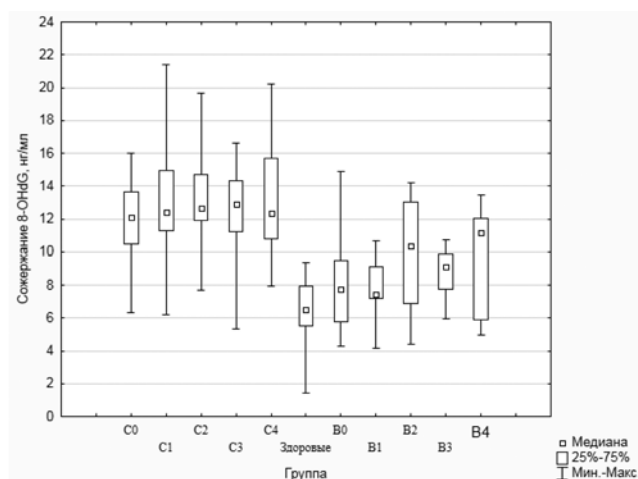
Во-вторых, в группе пациентов с гепатитом С наблюдалось большее количество апоптотических клеток на продвинутых стадиях фиброза по сравнению с тем же показателем пациентов с

гепатитом В (см. табл. 2). Следует отметить, что клетки, погибшие путем некроза, зафиксированы не были.

Кроме того, в исследуемых группах были выявлены отличные от контрольной показатели окисления ДНК. Так, уровень 8-OHdG в сыворотке у больных ХВГС достоверно выше на всех стадиях фиброза ( $p = 0,0001$ ). При гепатите В были зафиксированы значимые различия (табл. 3) только на продвинутых стадиях фиброза F2 ( $p = 0,013$ ) и F4 ( $p = 0,01$ ). Внутригрупповые отличия на различных стадиях фиброза F0 ( $p = 0,002$ ), F1 ( $p = 0,00002$ ), F2 ( $p = 0,007$ ), F3 ( $p = 0,006$ ), F4 ( $p = 0,01$ ) оказались статистически значимыми и для пациентов с ХВГС и с ХВГВ (рис. 3).



**Рис. 2.** Степень деструкции ДНК лимфоцитов в зависимости от стадии фиброза и этиологического фактора, % ДНК в хвосте кометы



**Рис. 3.** Содержание 8-OHdG в сыворотке пациентов исследуемых групп

Таблица 3

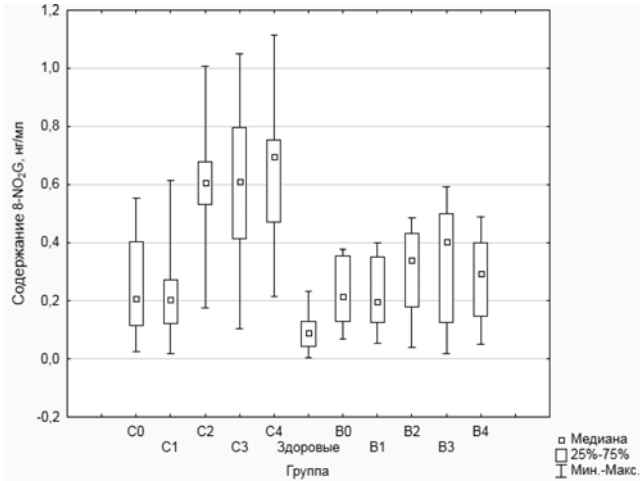
**Основные биохимические маркеры повреждения ДНК и антиоксидантной активности**

Группа		8-OHdG, нг/мл (Медиана ± ст. отклонение [Q25%;Q75%])	8-NO2G, нг/мл	ОАА, ммоль тролокса/л
F0	B	6,49±1,72 [5,51; 7,92]	0,09±0,06 [0,04; 0,13]	2,0±0,6 [1,8; 2,4]
	C	7,78±3,12 [5,79; 9,46]	0,21±0,12 [0,13; 0,36]	1,7±0,3 [1,4; 1,8]
F1	B	12,12±2,37 [10,51; 13,65]***	0,21±0,16 [0,12; 0,40]	1,6±0,7 [1,4; 2,3]
	C	7,46±1,97 [7,18; 9,11]	0,20±0,12 [0,13; 0,35]	1,7±0,4 [1,4; 1,8]
F2	B	12,41±3,51 [11,32; 14,69]***	0,20±0,14 [0,12; 0,27]*	1,7±0,2 [1,6; 1,9]
	C	10,37±3,36 [6,87; 13,04]**	0,34±0,16 [0,18; 0,43]*	1,5±0,5 [0,9; 1,6]
F3	B	12,68±2,97 [11,94; 14,69]***	0,61±0,27 [0,41; 0,80]***	1,7±0,3 [1,4; 1,9]*
	C	9,09±1,45 [7,79; 9,84]	0,40±0,21 [0,13; 0,50]**	1,8±0,4 [1,3; 1,9]
F4	B	12,92±2,79 [11,21; 14,32]***	0,61±0,27 [0,41; 0,80]***	1,4±0,4 [1,1; 1,8]*
	C	11,17±3,29 [5,92; 12,07]**	0,29±0,14 [0,15; 0,40]*	1,5±0,5 [1,2; 1,7]**
		12,36±3,48 [10,81; 15,69]***	0,70±0,21 [0,47; 0,75]***	1,0±0,6 [0,5; 1,5]***

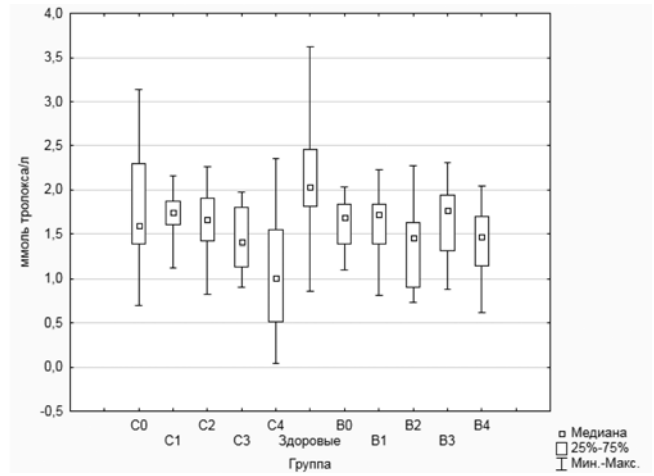
\* –  $\rho < 0,05$ ; \*\* –  $\rho < 0,01$ ; \*\*\* –  $\rho < 0,001$ .

Самый высокий уровень 8-NO2G был зафиксирован в группе F4 при ХВГС и составил  $0,70 \pm 0,21$  нг/мл ( $\rho = 0,0015$ ). Обнаружены статистически значимые отличия (см. табл. 3) от показателя нормы в группах F1 ( $\rho = 0,04$ ), F2 ( $\rho = 0,00012$ ), F3 ( $\rho = 0,0001$ ), F4 при ХВГС и в группах F2 ( $\rho = 0,018$ ), F3 ( $\rho = 0,0013$ ), F4 ( $\rho = 0,04$ ) при ХВГВ. Внутригрупповые различия зафиксированы между идентичными группами F2 ( $\rho = 0,0001$ ), F3 ( $\rho = 0,0004$ ), F4 ( $\rho = 0,0002$ ) больных ХВГС и ХВГВ (рис. 4).

При исследовании общей антиоксидантной активности у пациентов отмечалась тенденция к её истощению с развитием фибротических изменений (рис. 5), однако достоверные различия в сравнении с группой контроля были зафиксированы только на стадии фиброза F3 ( $\rho = 0,03$ ) и F4 ( $\rho = 0,00019$ ) при ХВГС и F2 ( $\rho = 0,02$ ), F4 ( $\rho = 0,01$ ) при ХВГВ (см. табл. 3). Статистически значимых различий внутри групп не установлено.



**Рис. 4.** Содержание 8-NO<sub>2</sub>G в сыворотке пациентов исследуемых групп



**Рис. 5.** Общая антиоксидантная активность сыворотки в исследуемых группах

У пациентов с ХВГС показаны статистически значимые корреляции между стадией фиброза печени по METAVIR, степенью деструкции ДНК лимфоцитов и уровнем 8-NO<sub>2</sub>G (табл. 4). Корреляция между стадией фиброза и уровнем 8-ОНdG была средней силы, а с ОАА она обратная.

При ХВГВ также отмечаются сильная корреляция между стадией фиброза и % ДНК в хвосте кометы, средней силы – с уровнем 8-NO<sub>2</sub>G и 8-ОНdG и отрицательная с ОАА.

В ходе работы изучен уровень метаболитов повреждений ДНК, протекающих за счет окисления ОН-радикалов и NO-радикалов. Оба пути активно реализуются во всех эукариотических клетках и могут изменять эпигеном [10]. Как известно, эпигенетические изменения могут носить положительный характер, например при видовой изменчивости признаков в целях адаптации, но могут быть и губи-

тельными, являясь пусковым механизмом к злокачественной трансформации клетки [8]. Последний вариант, к сожалению, встречается чаще. Нами было установлено, что с возрастанием стадии фиброза возрастает и уровень продуктов повреждения – 8-NO<sub>2</sub>G и 8-ОНdG. При гепатите С уровень окислительного стресса выше в связи с патофизиологическими особенностями [5]. Неструктурный протеин 3 вируса гепатита С (NS3) активирует фермент NO-синтазу (iNOS), которая активно продуцирует NO-радикал, являющийся причиной двунигетевых разрывов ДНК и мутаций. При гепатите В механизм NO-зависимого повреждения несколько другой. На трансгендерных мышах, экспрессирующих протеин X вируса гепатита В, выполняющий многочисленные регуляторные функции, отмечены делеции в гене, кодирующем iNOS, что может способствовать увеличению количества данного фермента [7].

Таблица 4

**Коэффициент корреляции между исследуемыми параметрами в группах больных ХВГС и ХВГВ**

Исследуемый контингент больных	Исследуемый параметр					Исследуемый параметр
	Стадия фиброза	% ДНК в хвосте кометы	8-NO <sub>2</sub> G	8-ОНdG	ОАА	
Гепатит С	1	0,7682*	0,7866*	0,6258*	-0,5171*	Стадия фиброза
	0,7682*	1	0,6161*	0,5550*	-0,3619*	% ДНК в хвосте кометы
	0,7866*	0,6161*	1	0,4722*	-0,3251*	8-NO <sub>2</sub> G
	0,6258*	0,5550*	0,4722*	1	-0,3004*	8-ОНdG
	-0,5171*	-0,3619*	-0,3251*	-0,3004*	1	ОАА
Гепатит В	1	0,853	0,5739*	0,4788*	-0,4604*	Стадия фиброза
	0,8530*	1	0,3997*	0,3860*	-0,3172*	% ДНК в хвосте кометы
	0,5739*	0,3997*	1	0,2305*	-0,3243*	8-NO <sub>2</sub> G
	0,4788*	0,3860*	0,2305*	1	-0,139	8-ОНdG
	-0,4604*	-0,3172*	-0,3243*	-0,139	1	ОАА

\* – p<0,05.

Известна роль антиоксидантов в предотвращении окислительного стресса и его снижения [1]. В качестве таких молекул с антиоксидантной активностью могут выступать как высокомолекулярные вещества, например белки, так и низкомолекулярные — витамины, аминокислоты и т.п. [4] Данные проведенного исследования показали, что количество низкомолекулярных антиоксидантов, которые составляют основной пул в организме, — довольно стабильная величина в сыворотке крови. Хотя даже она несколько уменьшается на продвинутых стадиях фиброза, что, по-видимому, можно объяснить ее расходом при интенсификации окислительного стресса.

Настоящее исследование показало корреляцию между повреждениями ДНК в лимфоцитах периферической крови и клинической стадией фиброза печени, оцениваемого по шкале METAVIR как у пациентов с ХВГС, так и с ХВГВ. При гепатите С повреждения ДНК значительны и стремительно увеличиваются даже на начальных стадиях фиброза [2], а при гепатите В они плавно нарастают с развитием фибротического процесса в печени. Это можно объяснить и большими количествами биохимических маркеров окислительного стресса — 8-NO<sub>2</sub>G и 8-OHdG, и уменьшением ОАА на стадии цирроза печени в исходе ХВГС по сравнению с ХВГВ.

### Выводы

1. Выявлен генотоксический эффект влияния вирусов гепатита В и С на ДНК лимфоцитов. Отмечено увеличение степени фрагментации ДНК с прогрессированием фиброза печени в обеих группах. Выявлена корреляция между стадией фиброза и биохимическими маркерами повреждения ДНК, а также показано декомпенсаторное снижение ОАА сыворотки на продвинутых стадиях фиброза печени.

2. Весьма перспективно продолжить дальнейшее изучение патоген-ассоциированных молекулярных паттернов и ассоциированных с повреждающими факторами молекулярных паттернов в патогенезе фиброобразования при хронических вирусных гепатитах, что представляется весьма перспективным в качестве прогностических моделей для оценки риска развития гепатоцеллюлярной карциномы.

### Литература

1. Оценка генотоксичности тетрахлорметана и защитного действия силибинина и хаурантина с помощью метода ДНК-комет в печени крыс / А.В. Кропотов [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2013. — № 2. — С. 63–66.

2. Попов, А.Ф. Метод ДНК-комет в диагностике фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С / А.Ф. Попов [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2015. — № 2. — С. 29–33.

3. Чернигина, И.А. Новая версия метода ДНК-комет / И.А. Чернигина, Т.Г. Щербатюк // Современные технологии в медицине. — 2016. — № 1. — С. 20–27.

4. Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D., Bartosz M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity / G. Bartosz, A. Janaszewska, D. Ertel, M. Bartosz // Biochemistry and molecular biology international. — 1998. — №3. — с.519-528.

5. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C viruses / S. Grossi, A. Sumberaz, M. Gosmar, F. Mattioli, G. Testino, A. Martelli // European Journal of Gastroenterology & Hepatology. — 2008. — №1. — с.22-25.

6. Iwakiri Y. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase. Clinical and molecular hepatology. — 2015. — №4. — с.319-325.

7. Iwakiri Y., Kim M.Y. Nitric oxide in liver diseases / Y. Iwakiri, M.Y. Kim // Trends pharmacological science. — 2015. — №8. — с.524-536.

8. Li P., Ramm G.A., Macdonald G.A. Value of the 8-oxodG/dG ratio in chronic liver inflammation of patients with hepatocellular carcinoma / P. Li, G.A. Ramm, G.A. Macdonald // Redox Biology. 2016. — doi: 10.1016/j.redox.2016.02.003.

9. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis / L. Cao, X.B. Quan, W.J. Zeng, X.O. Yang, M.J. Wang // Journal of cell death. — 2016. — №9. — с.19-29.

10. Nitrate and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells / S. Kawanishi, S. Ohnishi, N. Ma, Y. Hiraku, S. Oikawa, M. Murata // Genes and environment. 2016. — doi: 10.1186/s41021-016-0070-8

11. Olive P.L., Banath J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells / P.L. Olive, J.P. Banath // Nature protocols. — 2006. — №1. — с.23-29

12. Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis / A.I. Ivanov, V.T. Valuev-Elisston, D.A. Tyurina, O.N. Ivanova, S.N. Kochetkov, B. Bartosz, M.G. Isagulians // Oncotarget. — 2017. — №3. — с.3895-3932.

13. Relationship between levels of DNA damage in lymphocytes and histopathological severity of chronic hepatitis C and various clinical forms of hepatitis B / C. Bolukbas, F.F. Bolukbas, A. Kocyigit, M. Aslan, S. Selek, M. Bitiren, M. Ulukanligil // Journal of gastroenterology and hepatology. — 2006. — №3. — с.610-616.

### References

1. Estimating carbon tetrachloride toxicity and protective action of silibinin and haurantin using DNA-comet assay in rat liver / A.V. Kropotov, V.P. Chelomin, V.V. Slobodskova, E.E. Solodova, A.O. Mikhailov // Pacific medical journal (Russian journal — Tihookeansky medicinskiy jurnal). — 2013. — №2. — с.63-66.

2. Popov A.F., Mikhailov A.O., Ivanova N.S., Simakova A.I. Method of DNA comet-assay in the diagnosis of liver in patients with chronic viral hepatitis C / A.F. Popov, A.O. Mikhailov, N.S. Ivanova, A.I. Simakova // Epidemiology and infectious diseases (Russian journal -Epidemiologiya i infektionnye bolezni). — 2015. — №2. — с.29-33.

3. Chernigina I.A., Schherbatyuk T.G. A new version of comet assay / I.A. Chernigina, T.G. Schherbatyuk // Modern technology in medicine (Russian journal — Sovremennye tehnologii v medicine). — 2016. — №1. — с.20-27.

4. Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D., Bartosz M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity / G. Bartosz, A. Janaszewska, D. Ertel, M. Bartosz // Biochemistry and molecular biology international. — 1998. — №3. — с.519-528.

5. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C

viruses / S. Grossi, A. Sumberaz, M. Gosmar, F. Mattioli, G. Testino, A. Martelli // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. — 2008. — №1. — с.22-25.

6. Iwakiri Y. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase. *Clinical and molecular hepatology*. — 2015. — №4. — с.319-325.

7. Iwakiri Y., Kim M.Y. Nitric oxide in liver diseases / Y. Iwakiri, M.Y. Kim // *Trends pharmacological science*. — 2015. — №8. — с.524-536.

8. Li P., Ramm G.A., Macdonald G.A. Value of the 8-oxodG/dG ratio in chronic liver inflammation of patients with hepatocellular carcinoma / P. Li, G.A. Ramm, G.A. Macdonald // *Redox Biology*. 2016. — doi: 10.1016/j.redox.2016.02.003.

9. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis / L. Cao, X.B. Quan, W.J. Zeng, X.O. Yang, M.J. Wang // *Journal of cell death*. — 2016. — №9. — с.19-29.

10. Nitritative and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells / S. Kawanishi, S. Ohnishi, N. Ma, Y. Hiraku, S. Oikawa, M. Murata // *Genes and environment*. 2016. — doi: 10.1186/s41021-016-0070-8

11. Olive P.L., Banath J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells / P.L. Olive, J.P. Banath // *Nature protocols*. — 2006. — №1. — с.23-29

12. Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis / A.I. Ivanov, V.T. Valuev-Elisston, D.A. Tyurina, O.N. Ivanova, S.N. Kochetkov, B. Bartosch, M.G. Isaguliant // *Oncotarget*. — 2017. — №3. — с.3895-3932.

13. Relationship between levels of DNA damage in lymphocytes and histopathological severity of chronic hepatitis C and various clinical forms of hepatitis B / C. Bolukbas, F.F. Bolukbas, A. Kocyigit, M. Aslan, S. Selek, M. Bitiren, M. Ulukanligil // *Journal of gastroenterology and hepatology*. — 2006. — №3. — с.610-616.

---

*Авторский коллектив:*

*Михайлов Александр Олегович* — аспирант кафедры инфекционных болезней Тихоокеанского государственного медицинского университета; тел.: +7-981-778-68-74, e-mail: mao1991@mail.ru

*Попов Александр Федорович* — профессор кафедры инфекционных болезней Тихоокеанского государственного медицинского университета, д.м.н., профессор; тел.: +7-914-704-56-20, e-mail: doctor.popov@mail.ru

*Иванова Надежда Семеновна* — заведующая кафедрой общей и биологической химии Тихоокеанского государственного университета, к.х.н., доцент; тел.: +7-924-432-73-97, e-mail: ivanova306@rambler.ru

*Симакова Анна Ивановна* — заведующая кафедрой инфекционных болезней Тихоокеанского государственного медицинского университета, д.м.н., доцент; тел.: +7-902-557-19-58, e-mail: anna-inf@yandex.ru