

STRESUL OXIDATIV ÎN HEPATITELE CRONICE LA COPIL

Alice N. Azoicăi, Bogdan A. Stana

*Clinica II Pediatrie, Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii „Sf. Maria”, Iași
Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași*

REZUMAT

Stresul oxidativ reduce eficacitatea mecanismelor efectorii ale răspunsului imun, făcând celulele mai susceptibile la apoptoză. La nivelul celulelor limfoide, radicalii liberi interferă cu răspunsul la tratamentul antiviral, determinând rezistența la terapie și favorizând cronicizarea infecției. Unul dintre factorii responsabili de stresul oxidativ în infecția cronică cu hepatită virală B este producția crescută de citokine proinflamatorii. Virusul hepatitei C poate induce direct stres oxidativ în hepatocite; expresia genelor core ale VHC a fost asociată cu creșterea speciilor reactive de oxigen (SRO), scăderea intracelulară și/sau mitocondrială a conținutului de glutation (GSH) și creșterea nivelului tioredoxinei oxidate și a produșilor peroxidării lipidice. Nivelul crescut al malondialdehidei (MDA) în serul pacienților cu hepatocarcinom, ca produs al stresului oxidativ, semnalează fidelitatea acestui marker în cuantificarea severității leziunii hepatice.

Reducerea stresului oxidativ se poate face utilizând medicația antioxidantă (hepatoprotectoare, acid ursodeolic și vitaminele A, C, E), acest demers reprezentând un beneficiu important pentru pacient, după cum rezultă și din studiile întreprinse.

Cuvinte cheie: stres oxidativ, hepatită cronică, copil

Stresul oxidativ reduce eficacitatea mecanismelor efectorii ale răspunsului imun, făcând celulele mai susceptibile la apoptoză. La nivelul celulelor limfoide, radicalii liberi interferă cu răspunsul la tratamentul antiviral, determinând rezistența la terapie și favorizând cronicizarea infecției.

Virusurile hepatitice B și C intervin în amplificarea stresului oxidativ, în infecția cronică, prin mecanisme diferite. Unul dintre factorii responsabili de stresul oxidativ în infecția cronică cu virus B este producția crescută de citokine proinflamatorii. La acești pacienți s-au decelat niveluri crescute de TNF α , factor responsabil de creșterea ratei de producție a superoxizilor la nivel mitocondrial. De asemenea, la pacienți cu hepatită virală B cronică (VHB) s-au obiectivat scăderi ale activității glutatoniului (GST), direct proporțional cu rata de progresie spre hepatocarcinom. Frecvența mai mare a pacienților cu hepatită virală C (HVC) la care stresul oxidativ se manifestă pregnant, ducând la rezistență terapeutică poate fi explicată prin existența unor depozite celulare de fier mai bine reprezentate la acești pacienți, fierul servind ca substrat pentru activarea cascadei stresului oxidativ. (1)

Mecanismele stresului oxidativ în infecția cu VHB

Speciile reactive de oxigen și produșii de peroxidare lipidică pot contribui atât la instalarea, cât și la progresia fibrozei hepatice. În plus, stresul oxidativ afectează în mod direct ADN-ul viral, putând conduce la dezvoltarea carcinomului hepatocelular (HCC).

Cengiz et. al (2005) au evaluat statusul oxidativ folosind, în principal, măsurarea răspunsul antioxidant total (TAR) al subiecților cu HVB cronică sau ciroză. (2) Din aceleași probe de plasmă a fost măsurat și nivelul total de peroxid. Raportul dintre totalul nivelului de peroxid și valoarea TAR din plasmă a fost definit ca indice de stres oxidativ. Au fost incluși în studiu un număr de 33 de bolnavi, 20 de bărbați și 13 femei, cu vârsta medie de $39 \pm 12,8$ ani. Pacienții cu ciroză hepatică de origine HVB (în număr de 12) au fost 7 bărbați și 5 femei, cu vârsta medie de $40,9 \pm 11,6$ ani, iar lotul martor a cuprins 16 subiecți, 9 de sex masculin și 7 de sex feminin, cu vârsta medie de $31,6 \pm 6$ ani, fără suferință hepatică. Răspunsul TAR a fost semnificativ mai mic la pacienții cu ciroză hepatică față de grupul-control. Diferența dintre subiecții cu HVB cronică și su-

Adresa de corespondență:

Bogdan A. Stana, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa”, Str. Universității nr.16, Iași
E-mail: bogdan.stana@gmail.com

biecții cu ciroză hepatică, în ceea ce privește TAR nu a fost semnificativă din punct de vedere statistic. Nivelul total de peroxid plasmatic al subiecților cu VHB și ciroză a fost semnificativ mai mare decât în grupul-control. Nu a existat o corelație semnificativă între valoarea TAR și cea a TGP. Totuși, la bolnavii cu hepatită cronică B, nivelul TGP seric s-au corelat pozitiv cu nivelul total de peroxid. (2)

Leziunile tisulare dobândite prin stres oxidativ în hepatita virală cronică B sunt însoțite de o creștere semnificativă a nivelului plasmatic al citokinelor fibrogenice, TGF β , respectiv TNF α . În plus, speciile reactive de oxigen acumulate în cantități mari în țesuturile inflamate pot provoca leziuni în celulele-gazdă și pot induce deteriorarea ADN-ului, cu apariția de noi mutații. Deteriorarea ADN-ului sub acțiunea stresului oxidativ joacă un rol important în dezvoltarea cirozei hepatice de etiologie VHB și în progresia spre hepatocarcinom. (2,3)

Cuantificarea nivelului de aflatoxină B (AFB1), evaluarea stresului oxidativ și modificarea biomarkerilor de replicare virală au evidențiat un nivel plasmatic al AFB1 semnificativ mai mare în cazul pacienților cu hepatocarcinom, comparativ cu cei care prezintă hepatită cronică de origine HVB fără degenerescență malignă. Rezultatele indică o contribuție semnificativă a infecției cu VHB la acțiunea stresului oxidativ într-o populație cu expunere la AFB1, care ar putea crește în mod substanțial riscul evolutiv spre HCC. (3)

Mutații pre-S pot să influențeze și activitatea COX-2 prin modularea NF κ B și a p38 MAPK. Excesul de COX-2, detectat în multe tipuri de cancer, a fost legat de progresia bolii. Modelele experimentale (șoareci transgenici) care exprimă proteine pre-S mutante au niveluri mai ridicate de COX-2 în mostrele tisulare recoltate din ficat și rinichi. În mod similar, expresia crescută a COX-2 a fost observată în țesuturile umane recoltate de la indivizi cu HCC de origine HVB.

Hui-Ching Wang et al. au studiat efectul mutațiilor pre-S, stresul oxidativ la nivelul reticulului endoplasmatic (RE) și evoluția spre cronicizare, ciroză și HCC la pacienții cu infecție VHB (4). Proteinele pre-S mutante sunt acumulate în ER și induc semnale de stres către reticulul endoplasmatic (Fig. 1). Utilizând o metodă colorimetrică dublu-marcată cu imunofluorescență, autorii au observat aglomerări consistente de proteine pre-S mutante și calregulină în RE, ceea ce sugerează că aceste proteine mutante, atât Δ S1-LHBs, cât și Δ S2-LHBs, se acumulează la acest nivel. Mutații pre-S pot induce ulterior semnale de stres, ceea ce duce către degenerescență celulară și evoluție spre HCC. De ase-

menea, proteinele pre-S induse de genele mutante pot induce instabilitate genomică prin stres oxidativ, producând deteriorarea ADN-ului cu creșterea frecvenței de apariție a unor noi mutații.

Pentru a demonstra că pacienții cu VHB și cu expresie crescută a proteinelor pre-S mutante comportă un risc mai mare de dezvoltare a HCC, autorii au întreprins un studiu cazuistic într-un grup de pacienți AgHBs pozitivi. S-au luat în studiu 68 de bărbați cu HCC nou diagnosticat și 132 de subiecți în lotul martor cu infecție HVB fără HCC. Printre aceste cazuri, 14 bărbați cu HCC (20,6%) și 11 din lotul martor (8,3%) au avut mutante detectabile de proteine pre-S în probele recoltate. Pe o perioadă de urmărire de 10 ani, pacienții care au dezvoltat mutante pre-S au avut un risc mai mare de a dezvolta HCC decât ceilalți (HI Yang și CJ Chen, date nepublicate). Aceste date indică faptul că apariția mutațiilor de pre-S poate prezenta un risc ridicat de a dezvolta HCC la pacienții cu infecție cronică cu VHB.

Studiile acumulate susțin ipoteza conform căreia stresul oxidativ poate avea un rol critic în determinarea și progresia leziunilor hepatice, fiind asociat cu severitatea bolii și starea de replicare a virusului în infecția cu virus B. Astfel, se impune evaluarea posibilității unor linii terapeutice țintite pe această linie patogenică.

Mecanismele stresului oxidativ în infecția cu VHC

Aplicarea unor criterii de eligibilitate pentru tratamentul antiviral a incitat studierea rolului stresului oxidativ. (5) Mecanismele de acțiune prin care se produc aceste leziuni sunt:

- activarea NAD(P)H oxidazei din celulele Kupffer și polimorfonuclearelor în timpul inflamației;
- supraîncărcarea cu fier și peroxidarea lipidică;
- activarea NAD(P)H oxidazei de către proteina NS3;
- creșterea producției mitocondriale de SRO/SRN prin lanțul de transport electronic legat de proteinele NS5A și proteinelor core;
- scăderea producției de GSH din cauza leziunilor hepatice;
- scăderea antioxidanților și a expresiei genelor acestora;
- alcoolul, drogurile și alte toxice;
- creșterea citokinelor care augmentează SRO;
- creșterea expresiei CYP2E1;
- creșterea expresiei/activității Cox-2.

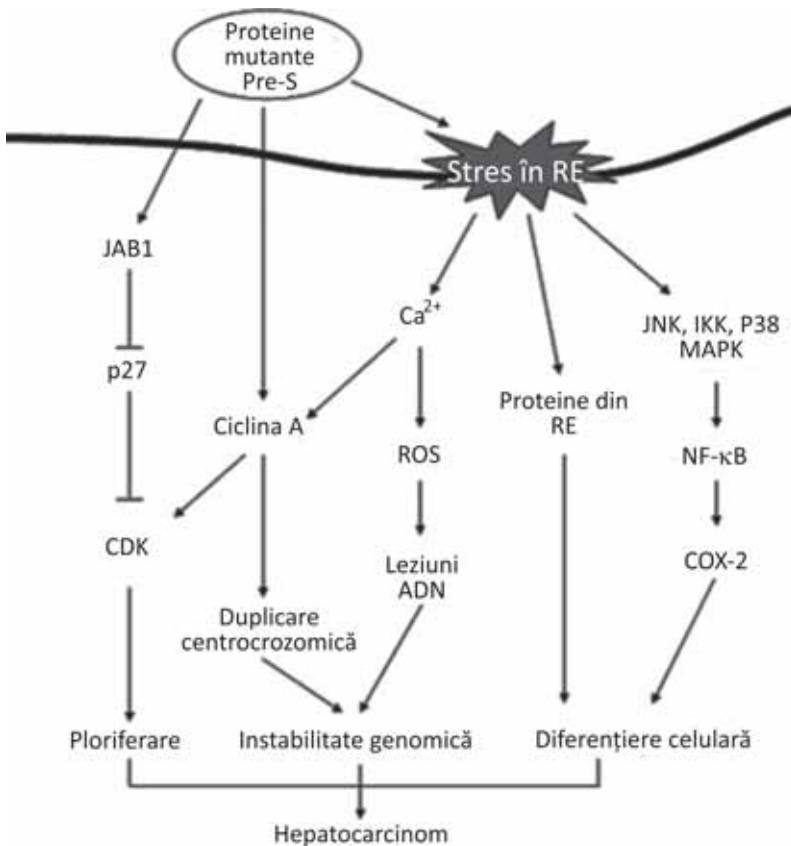


FIGURA 1. Patogenia oncogenezei indusă de proteinele mutante pre-S în hepatita B, adaptat după Hui-Ching Wang, Wenya Huang, Ming-Der Lai, Ih-Jen Su, *Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis*, *Cancer Science*, Volume 97, Issue 8, August 2006 Pages 683–688 (CDK, ciclin dependent kinaza; COX-2, ciclooxigenaza-2; RE, reticul endoplasmatic; IKK, Ikappa B kinaza; JAB1, Jun activation domain-binding protein 1; JNK, Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinaza; NFκB, nuclear factor κB; ROS-specii reactive de oxigen)

Existența unor depozite de fier, mai bine reprezentate în infecția VHC, facilitează stresul oxidativ, agravând rezistența la tratament. Fierul servește ca substrat în activarea stresului oxidativ la nivelul leziunii hepatice.

Pe de altă parte, studiile arată că VHC poate induce direct stres oxidativ în hepatocite. Expresia genelor core ale VHC a fost asociată cu creșterea SRO, scăderea intracelulară și/sau mitocondrială a conținutului de GSH și creșterea nivelului tioredoxinei oxidate și a produșilor peroxidării lipidice.

Infecția cronică C progresează în mod frecvent spre ciroză, insuficiență hepatică sau hepatocarcinom. Pentru a elucida rolul stresului oxidativ în evoluția nefavorabilă a acestor pacienți, s-au evaluat nivelele sanguine și/sau urinare ale markerilor de peroxidare a lipidelor, precum și seleniul, vitaminele A, C, E într-un lot de 42 de pacienți cu hepatită C cronică. De asemenea, autorii au evaluat și gradul fibrozei hepatice la un subgrup de 33 de pacienți. (6)

Rezultatele au arătat că markerii peroxidării lipidice (în principal 8-isoprostane) au fost crescuți în plasma pacienților, iar nivelul de glutation redus mitocondrial și celular a scăzut semnificativ la aceștia. Antioxidanții (glutacionul, seleniul și vitaminele A, C și E) au înregistrat scăderi comparativ cu vârsta și sexul subiecților din lotul martor. Valo-

riile au fost mult mai scăzute în cazul subiecților cirofici, însă modificări semnificative au fost observate, de asemenea, și în grupul de non-cirofici. Scorul de fibroză s-a corelat pozitiv cu valorile urinare de 8-isoprostane și în mod negativ cu nivelul vitaminei A. În concluzie, după cum se reflectă în rezultatele obținute mai sus, stresul oxidativ este o caracteristică importantă a infecției cu virusul hepatitei C. Cu toate că scăderile produșilor antioxidanți au fost marcate mai sever în grupul pacienților cirofici, există dovezi clare ale influenței stresului oxidativ și la pacienții non-cirofici (6). Prin urmare, terapia antioxidantă poate avea un rol crucial în încetinirea progresiei bolii spre ciroză sau degenerescență malignă.

Dovezi indirecte sugerează că stresul oxidativ, asociat prejudiciului adus mitocondriei, are un rol important în evoluția nefavorabilă a infecției cu virus C. Unele studii au încercat să determine dacă proteina core VHC alterează funcția mitocondrială, contribuind astfel la inițierea și întreținerea stresului oxidativ (7). Astfel, au fost cuantificate proteina core VHC, exprimată în 3 linii celulare diferite, precum și speciile reactive de oxigen (ROS) și produșii de peroxidare a lipidelor. În 2 sisteme de expresie inductibile, nivelul proteinei core a crescut; de asemenea, produșii de peroxidare a lipidelor și expresia genelor antioxidante au înregistrat creșteri

semnificative. O secvență din proteina core exprimată la nivel mitocondrial a fost asociată cu redistribuția citocromului C din citosol, dovedind astfel încă o dată instalarea leziunilor dependente de stresul oxidativ la acest nivel. Sensibilitatea la stres oxidativ a fost observată la șoareci transgenici infectați cu VHC la care s-au înregistrat creșteri ale produșilor de peroxidare lipidică intrahepatici, ca răspuns la acțiunea tetraclorurii de carbon. Concluziile studiului au vizat prejudiciul oxidativ, care apare ca rezultat direct al expresiei proteinei core VHC atât *in vitro*, cât și *in vivo* și poate exercita un efect direct citopatic asupra mitocondriilor. Aceste rezultate oferă o perspectivă nouă în patogeneza hepatitei C, furnizând un raționament experimental pentru investigarea terapiei antioxidante ca linie terapeutică adjuvantă la acești pacienți.

Infecția cronică cu VHC este carcinogenetică (nu numai la nivel hepatic, dar și la nivel de țesut limfoid), efect corelat cu scăderea activității GST, dovedind rolul important al acestuia în determinarea efectelor citopatice ale VHC. Mai mult, s-au decelat creșteri ale nivelului malonil-dialdehidei în serul pacienților cu hepatocarcinom, sugerând drept marker fidel al leziunii hepatice cuantificarea alfa-GST, acesta găsiindu-se în concentrații mari în interiorul hepatocitelor. Nivelul alfa-GST crește rapid în sânge la momentul producerii leziunilor și scade la fel de rapid atunci când agresiunea încetează. Astfel, alfa-GST poate fi considerat cel mai sensibil marker al răspunsului la terapia antivirală. De asemenea, administrarea N-acetil-cisteinei concomitent cu interferon duce la răspuns susținut în cazul pacienților cu hepatocarcinom rezistent la tratamentul cu interferon. (8,9)

Aceste afirmații sunt susținute de studiul efectuat de către Görenek L et al (2006), pe un lot de 19 pacienți cu infecție cronică cu VHC, respectiv un lot martor de 28 de indivizi sănătoși. În ambele grupuri s-au dozat nivelele serice de alanin aminotransferază (ALT) și aspartat aminotransferază (AST), precum și nivelul de malondialdehidă (MDA), superoxid dismutază (SOD), precum și de glutatión peroxidază eritrocitară. Măsurătorile s-au efectuat înainte și după tratamentul antiviral cu interferon alfa-2b și ribavirină, timp de 48 de săptămâni (10).

Nivelurile serice ale MDA au crescut semnificativ la pacienții cu HCV cronică înainte de tratament, în comparație cu subiecții sănătoși. De asemenea, concentrația de MDA a scăzut semnificativ după tratament, ca și valorile ALT, AST în grupul acestor pacienți. Enzime antioxidante (superoxid dismutaza și glutatión peroxidaza) au avut nivele

semnificativ mai mici în eritrocitele pacienților cu hepatită cronică C înainte de tratament, comparativ cu grupul de control. În concluzie, rezultatele arată că pacienții cu infecție cronică cu VHC sunt sub influența stresului oxidativ, acțiunea acestuia fiind asociat cu niveluri mai scăzute ale enzimelor antioxidante. Deși interferonul și ribavirina, ca agenți antivirali, nu au capacitate antioxidantă, prin acțiunea lor de reducere a replicării virale ar putea reduce și inflamația și, probabil, prin acest mecanism, ar putea scădea și intensitatea stresului oxidativ indus de virus.

Așadar, reducerea stresului oxidativ se poate face utilizând medicația antioxidantă (hepatoprotectoarele, acidul ursodeoxicolic și vitamina E), acest demers reprezentând un beneficiu important pentru pacient.

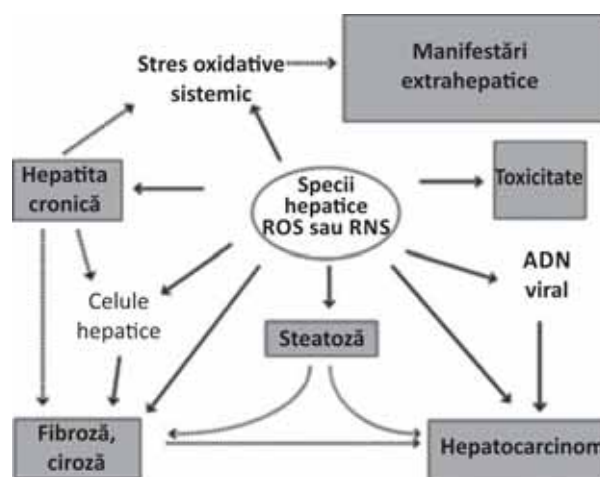


FIGURA 2. Efectele biologice ale speciilor reactive de oxigen/nitrogen în HVC (adaptat după Choi, J, Ou JHJ, *Mechanisms of Liver Injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus, Am J of Phys, May 2006, 290(5),847-851*)

Prezența stresului oxidativ este semnalată și prin valori serice crescute ale malondialdehidei MDA (marker pro-oxidativ), concomitent cu valori serice semnificativ scăzute ale glutatiónului redus (antioxidant endogen puternic), atât în hepatita cronică virală C cu manifestări extrahepatice la adulți, cât și în hepatita cronică virală B la pacienții pediatrici. Există, de asemenea, o corelație directă între valorile serice ale MDA, GSH și cele ale transaminazelor doar în hepatita acută virală C. Spre deosebire de faza acută, în infecția cronică doar valoarea MDA se corelează cu valorile transaminazelor. Aceste aspecte sugerează faptul că nivelurile serice ale MDA și GSH nu sunt în strânsă interdependență cu gradul de necroză hepatocelulară. (11) Nu s-a obținut corelație între ARN-VHC și valorile serice ale MDA și GSH nici în hepatita acută, și nici în

hepatita cronică virală C, ceea ce înseamnă că nivelul viremiei nu reflectă cu fidelitate intensitatea stresului oxidativ în sânge, fiind mai degrabă în strânsă interdependență cu valorile tisulare ale MDA, respectiv GSH.

Datele de laborator au arătat că tipul 0 al GSTM1 poate fi corelat cu evoluția mai severă a infecției cu VHC, cu o valoare predictivă pozitivă pentru cronicizare de 80%. Determinarea antigenelor HLA incriminate în cronicizarea infecției VHC la pacienții cu tipul 0 de GSTM1, cunoscut fiind rolul unora dintre ele în evoluția severă a infecției VHC, precum și în potențarea manifestărilor extrahepatice sunt un marker important de urmărit la acești pacienți. (11,12)

De asemenea, parametrii stresului oxidativ prezintă valori semnificativ mai alterate la pacienții pediatrici cu hepatită cronică virală C *versus* cei cu hepatită virală B. Cu toate că interferonul și ribavirina nu sunt agenți antioxidanți, prin capacitatea lor de a inhiba multiplicarea virală reduc inflamația și, implicit, evoluția spre fibroză hepatică, ameliorând stresul oxidativ. Rezultatele favorabile obținute în urma tratamentului antiviral, cu toate că nivelul viremiei a fost mare, se datorează, cel mai probabil, vârstei tinere a pacienților și evoluției relativ recente a hepatitei.

Prezența manifestărilor extrahepatice nu modifică nivelul markerilor de stres oxidativ. Predominanța tipului 0 GSTM1 este demonstrată în procente relativ egale atât la pacienții cu infecție cronică VHC fără manifestări extrahepatice, cât și la cei care asociază aceste manifestări, neputându-se asocia apariția manifestărilor extrahepatice cu stresul oxidativ. (11) Așadar, malondialdehida serică, glutathionul seric redus și glutathion S transferază pot fi utilizate ca biomarkeri ai severității și evoluției infecției cu virusul hepatitic C.

Studiile recente care au vizat patogenia infecțiilor hepatitice au dovedit că producția în exces a speciilor reactive de oxigen (SRO) este implicată mai ales în patogeneza hepatitei C. (15) S-a evaluat astfel statusul plasmatic antioxidant al pacienților infectați cu VHC, atât al celor care au beneficiat de terapia standard, cât și al celor fără tratament antiviral. Măsurătorile s-au efectuat înainte și după su-

plimentarea cu vitaminele E, C și zinc (agenți antioxidanți). Biomarkerii stresului oxidativ au fost evaluați în cadrul a trei grupe de pacienți: lotul 1 – control; lotul 2 – pacienți cu VHC, fără tratament, dozate înainte și după suplimentarea zilnică a agenților antioxidanți (vitamina E 800 mg, vitamina C 500 mg și zinc 40 mg) timp de 6 luni; și lotul 3 – pacienți cu VHC tratați cu interferon pegylat asociat cu ribavirină. Acești pacienți din grupa 3 au fost investigați, de asemenea, înainte și după aceeași terapie antioxidantă. Înainte de tratamentul antiviral cu interferon și ribavirină, pacienții cu VHC au prezentat valori mari ale superoxid dismutazei, activitățile superoxid catalazei și glutathion peroxidazei fiind ridicate, și scăderea activității glutathion reductazei, în timp ce producția lipoperoxidării a fost crescută și glutathionul cu nivel mai scăzut în comparație cu grupul de control. Tratamentul cu terapia standard a intensificat activitățile catalazei și glutathion S-transferazei, a crescut conținutul de proteine de tip carbonil, ducând în final la epuizarea cantităților de glutathion. După suplimentarea cu agenți antioxidanți s-a produs scăderea activităților catalazei și glutathion S-transferazei, a scăzut lipoperoxidarea la pacienții incluși în lotul 2. În același timp, înainte de suplimentarea antioxidanților, AST și ALT, precum și GGT au prezentat creșteri semnificative la aceiași pacienți din lotul 2. Rezultatele au arătat ca pacienții cu VHC, fie că primesc sau nu terapie standard antivirală, prezintă risc de dezvoltare a leziunilor ireversibile cu progresie spre ciroză și/sau hepatocarcinom, în condițiile stresului oxidativ indus de virus. Suplimentarea cu agenți antioxidanți conferă o protecție eficientă pentru ambele grupuri, prin atenuarea proceselor de oxidare legate de boală.

În concluzie, atât infecția cronică hepatitică cu virus B, cât și cea cu virus C implică suferință tisulară prin stres oxidativ direct la nivel hepatocitar. Tracking-ul patogenic urmează mecanisme diferite de acțiune, care în final conduc la degenerescență malignă. Dovezile studiilor întreprinse impun dezvoltarea unor linii terapeutice în scopul reducerii stresului oxidativ, asociate tratamentului antiviral standard.