

УДК 616.988.76-092:616.36-002+615.284

АНЕМИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С, ПОЛУЧАЮЩИХ КОМБИНИРОВАННУЮ ПРОТИВОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ. ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА

Донцов Д.В., Амбалов Ю.М., Пройдаков М.А., Виноградова М.В., Кислов Е.О.

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия (344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29), d_dontcov@mail.ru

Применение комбинированной противовирусной терапии позволяет добиться устойчивого вирусологического ответа у больных хроническим гепатитом С, однако у некоторых пациентов на фоне лечения развиваются побочные эффекты. Особое место среди нежелательных проявлений специфической терапии хронического гепатита С занимают гематологические синдромы. В данной работе изучены некоторые особенности патогенеза анемии, развивающейся у больных хроническим гепатитом С на фоне приема противовирусных препаратов. С этой целью нами был выполнен ряд высокоспециализированных исследований: автоматический гематологический анализ, электронная микроскопия, определение активности ферментов антиоксидантной защиты, концентрации маркеров перекисного окисления липидов, уровня антиэритроцитарных антител, концентрации эндогенного эритропоэтина и ДНК полиморфизмов генов SOD2, CAT, GPX4. В общей сложности, в исследование было включено 224 пациента, получающих комбинированную противовирусную терапию хронического гепатита С.

Ключевые слова: хронический гепатит С, противовирусная терапия, анемия.

ANEMIA AT PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C, WHO ARE RECEIVING COMBINED ANTI-VIRUS THERAPY. THE SYMPTOMS, AND THE FEATURES OF PATHOGENESIS

Dontsov D.V., Ambalov J.M., Proydakov M.A., Vinogradova M.V., Kislov E.O.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia (344022, Rostov-on-Don, street. Nakhichevan, 29) d_dontcov@mail.ru

The patients with chronic hepatitis C, are receiving combined anti-virus therapy, have frequently the positive virological result. But some patients during the treatment can receive the development of adverse effects. A special place in this case occupies hematological syndromes. In this work we have studied some features of pathogenesis from anemia at patients with chronic hepatitis C, who receives combined anti-virus therapy. We had been executed special researches: automatic hematological the analysis, electronic microscopy, definition of activity of some enzymes and concentration of markers defeats of lipids by superoxide radicals, a level of antibodies against erythrocytes, concentration of human erythropoietin, and the DNA polymorphism of genes SOD2, CAT, GPX4. There are 224 patients, who are receiving combined anti-virus therapy of chronic hepatitis C, in this research.

Keywords: chronic hepatitis C, anti-virus therapy, anemia.

Введение. Хронический гепатит С (ХГС) является одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний человека [2, 3, 8]. Применение современной комбинированной противовирусной терапии (КПТ) ХГС позволяет добиться у многих пациентов полной элиминации возбудителя [4, 5, 6], однако, актуальной проблемой при этом остается развитие нежелательных явлений (НЯ), среди которых особое место занимают гематологические осложнения [9]. Одним из наиболее серьезных гематологических синдромов у больных ХГС является КПТ-ассоциированная анемия, развитие которой значительно увеличивает риск возникновения состояний, угрожающих жизни пациентов. Предполагается, что основной причиной анемии, в данном случае, является развитие

гемолиза вследствие накопления внутри эритроцитов метаболитов рибавирина, являющегося, как известно, одним из компонентов КПТ [7]. К сожалению, патологические изменения, происходящие при этом с красными клетками крови, а также особенности самого гемолиза остаются практически не изученными.

Цель исследования – детально изучить патогенез и клинические проявления КПТ-ассоциированной анемии у больных ХГС.

Материал и методы. В исследование было включено 224 больных ХГС, имеющих показания к КПТ. Генотип HCV 1a встречался у 3,1 %, 1b – 55,3 %, 3a – 28,6 % и 2a – 16,1 % человек. Уровень вирусной нагрузки (ВН) у 29,9 % пациентов составил $<3 \times 10^5$ МЕ/мл, у 46,9 % – 3×10^5 - 6×10^5 МЕ/мл и у 23,2 % $>6 \times 10^5$ МЕ/мл. Всем испытуемым была назначена КПТ согласно современным международным стандартам. 51,8 % пациентов получали рибавирин в сочетании с пегилированными α -интерферонами (пег-ИНФ- α), а 48,2 % – с «короткими». КПТ прекращалась при отсутствии раннего вирусологического ответа (РВО) и/или развитии у пациентов тяжелых НЯ. В ходе работы наблюдаемым лицам был выполнен ряд высокоспециализированных исследований. Определение показателей гемограммы проводилось методом автоматического гематологического анализа («Advia 2120i» (Siemens)) непосредственно перед началом КПТ, через 4, 8, 12, 24 и 48 (лица, инфицированные 1-м генотипом HCV) недель КПТ. Морфологическая характеристика эритроцитов была выполнена в монослое мазков периферической крови (ПК) с использованием программы «Эритроцитометрия» и аппаратно-програмного комплекса «Мекос-Ц1». Внутриклеточная ультраструктура эритроцитов ПК изучалась с помощью трансмиссионной электронной микроскопии на просвечивающем электронном микроскопе «Tecnaï G² Spirit BioTWIN» (Philips, Нидерланды). Для изучения роли перекисного окисления липидов в патогенезе КПТ-ассоциированной анемии наблюдаемым пациентам было выполнено исследование активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР), а также содержания малонового диальдегида (МДА) и внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ) в плазме крови. Сывороточную концентрацию эндогенного эритропоэтина (ЕРО) определяли методом автоматического хемилюминесцентного иммуноанализа («IMMULITE 2000», Siemens Healthcare Diagnostics, США-Германия). Скрининг антиэритроцитарных антител проводился путем постановки прямого антиглобулинового теста Кумбса по методу Y. Lapierre с соавт. (1990), с использованием ID-карт «ScanGelTM COOMBS Anti-IgG» (Bio-Rad Laboratories, США-Франция). Перечисленные выше методы исследования проводились дважды: перед началом и сразу после завершения или вынужденного прекращения КПТ. Помимо этого у испытуемых лиц методом «ПЦР в реальном времени» было выполнено изучение

однонуклеотидных ДНК-полиморфизмов (SNP) гена супероксиддисмутазы-2 (SOD2) Ala16Val(rs4880), гена каталазы (CAT) -262C/T(rs1001179) и гена глутатионпероксидазы-4 (GPX4) 3'UTR,718C/T(rs713041). Для генотипирования SNP использовали аллель-специфичные зонды наборов реагентов "SNP-Скрин" (Синтол, РФ). Заключительным этапом явился тщательный статистический анализ полученных результатов, который был выполнен после полного завершения клинико-лабораторно-инструментального мониторинга всех пациентов.

Результаты. Из 224 больных ХГС полностью завершили курс КПТ 67,9 % человек. Устойчивый вирусологический эффект (УВО) был достигнут у 66,1 % пациентов, из них 28,6 % были инфицированы 1-м; 14,3 % – 2-м и 23,2 % – 3-м генотипами HCV. Среди получавших пег-ИФН- α частота УВО составила 55,2 %; получавших «короткие» – 77,8 %. У больных ХГС с 1-м генотипом HCV УВО отмечался в 51,6 % случаев; со 2-м и 3-м генотипами HCV – в 88,9 % и 81,3 % случаев соответственно.

При изучении степени тяжести КПТ-ассоциированной анемии была использована классификация Европейского общества медицинской онкологии, согласно которой выделяют легкую (Hb 10,0-11,9 г/дл), умеренную (Hb 8,0-9,9 г/дл) и тяжелую (Hb <8,0 г/дл) степени анемии. В результате было установлено, что на разных этапах КПТ анемия в общей сложности развилась у 37,5 % пациентов, при этом легкая степень отмечалась у 12,5 %; умеренная – у 19,6 % и тяжелая – у 5,4 % больных ХГС.

Среди пациентов с легкой степенью анемии 85,7 % предъявляли жалобы на общую слабость и быструю утомляемость. При развитии умеренной степени анемии 72,7 % больных ХГС дополнительно жаловались на одышку при незначительной физической нагрузке. Пациенты с тяжелой степенью анемии отмечали также головную боль, головокружение, шум в ушах – 66,7 %, сердцебиение и боль за грудиной – 33,3 %. Объективные изменения в виде акроцианоза, тахикардии, экстрасистолии, отека нижних конечностей по вечерам были выявлены исключительно у лиц с тяжелой степенью анемии – 66,7 % больных ХГС. У 21,4 % пациентов, начиная с 20 недели КПТ, было зафиксировано развитие спленомегалии. 25,5 % больных во время проведения КПТ неоднократно отмечали рецидивы лабиального герпеса, что вполне соответствует данным научной литературы [1].

Легкая степень анемии через 4 недели КПТ была зафиксирована у 23,2 %, через 8 недель – у 30,4 %, через 12 – у 24,1 %, через 24 – у 28,9 % и через 48 (пациенты с 1-м генотипом HCV) – у 11,8 % больных ХГС. Умеренная степень анемии через 12 недель КПТ отмечалась у 5,6 % больных ХГС, через 24 недели – у 13,2 % и через 48 недель – у 29,4 % пациентов. Развитие анемии тяжелой степени было впервые выявлено через 8 недель лечения у 1,8 % больных, что явилось единственной причиной отмены у них КПТ. У 3,7 %

пациентов тяжелая степень анемии сформировалась через 12 недель от начала КППТ, совпав при этом с отсутствием РВО, вследствие чего причина прекращения терапии носила «смешанный» характер. Коррекцию анемии выполняли при снижении уровня Hb <10,0 г/дл. У 2,2 % пациентов поэтапно была снижена доза рибавирина до 600 мг/сутки, 1,3 % больным в качестве альтернативы проводили терапию рекомбинантным ЕРО- α . У 16,1 % больных ХГС в ходе лечения концентрация Hb также снижалась <10,0 г/дл, однако коррекция КППТ-ассоциированной анемии не проводилась, поскольку соответствующие значения Hb отмечались у пациентов либо к моменту отмены КППТ вследствие отсутствия РВО (n=12), либо же – к моменту завершения полного курса противовирусной терапии (n=24).

Все участники исследования в зависимости от величины минимального уровня гемоглобина, зафиксированного за весь период КППТ (Hb_{min}), были разделены на три группы. В 1-ю группу (n=140) вошли лица, у которых Hb_{min} на протяжении КППТ оставался в пределах допустимой нормы, т.е. >11,9 г/дл. 2-я группа (n=28) включала больных ХГС с легкой степенью КППТ-ассоциированной анемии: Hb_{min} в пределах 10,0-11,9 г/дл. 3-ю группу (n=56) составили лица с умеренной и тяжелой степенью анемии: Hb_{min}<9,9 г/дл. Средний показатель Hb_{min} в 1-й группе оказался равен 12,44±0,2; во 2-й – 11,35±0,26 и в 3-й и – 9,15±0,31 г/дл. Перед началом КППТ среди пациентов 3-й группы в сравнении с 1-й и 2-й преобладали женщины; лица, инфицированные 1-м генотипом HCV; с индексом массы тела >25; а также получавшие в комбинации с рибавирином препараты пег-ИФН- α -2а (p<0,05). На старте КППТ средние показатели уровня Hb и количества эритроцитов во всех группах статистически не отличались друг от друга (p>0,05). Однако у пациентов 3-й группы достоверное снижение данных показателей было отмечено уже через 4 недели КППТ, в то время как у пациентов 1-й и 2-й – только через 12. В целом же вышеуказанные показатели практически на всех этапах КППТ были значительно ниже в 3-й группе (p<0,05). Что касается больных ХГС 1-й и 2-й группы, то статистически значимые отличия отмечались у них лишь на 8-й и 12-й неделях КППТ. Среди изменений средних величин эритроцитарных индексов в динамике КППТ во всех сравниваемых группах можно выделить лишь достоверное повышение уровня MCV. У всех пациентов в ходе лечения отмечалось увеличение абсолютного и относительного количества ретикулоцитов, наиболее выраженного на 24–48 неделях терапии. Кроме того, наблюдался т.н. «сдвиг формулы влево» с преобладанием незрелых форм ретикулоцитов.

Средний диаметр эритроцитов перед началом КППТ у больных ХГС во всех группах не имел значимых отличий, однако после завершения или вынужденного прекращения лечения – достоверно повышался (p<0,05). Удельный вес нормо-, микро- и макроцитов в среднем на старте КППТ в сравниваемых группах практически не отличался друг от друга (p>0,05). К окончанию КППТ наблюдалось увеличение относительного количества макроцитов, особенно

в 3-й группе пациентов ($p < 0,05$). Среди морфологических форм эритроцитов у больных ХГС в ПК определялись дискоциты (двояковогнутые дискоциты, эхиноциты, стоматоциты и сфероциты), эллиптоциты, патологические (дакриоциты, кодоциты и акантоциты) и дегенеративно-измененные формы клеток. После проведения КПТ средняя частота встречаемости двояковогнутых дискоцитов во всех группах достоверно снижалась. При этом процентное содержание стоматоцитов в 1-й группе больных ХГС возросло от исходного в среднем в 2,1; эхиноцитов – в 2,5; сфероцитов – в 4,6; патологических форм – в 3,8 и дегенеративно-измененных клеток – в 4,7 раза. У пациентов 2-й группы число стоматоцитов увеличилось в среднем в 2,9; эхиноцитов – в 3,1; сфероцитов – в 7,3; патологических форм – в 4,9 и дегенеративно-измененных клеток – в 10,6 раз. И, наконец, в 3-й группе относительное количество стоматоцитов в ходе КПТ возросло в 3,6; эхиноцитов – в 3,75; сфероцитов – в 13,3; патологических форм – в 6,3 и дегенеративно-измененных клеток – в 16,5 раз. В ходе исследования во всех сравниваемых группах были выявлены пациенты с разнообразными структурными дефектами как цитоплазматической мембраны эритроцитов (локальное разрыхление, фрагментация, микро- и макровезикулообразование, формирование почкообразных выпячиваний), так и их стромы (образование полостей и эндовезикул, появление клеток с неравномерной электронной плотностью и разной степенью гемоглобинизации). Как показал сравнительный анализ, уже на старте терапии в 3-й группе пациентов гораздо чаще встречались лица с вышеуказанными дефектами. После завершения КПТ удельный вес больных ХГС с выявленными структурными изменениями эритроцитов достоверно повысился во всех трех группах ($p < 0,05$). Исходные показатели активности ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ) у больных ХГС 1-й и 2-й группы в среднем существенно не отличались друг от друга ($p > 0,05$). У пациентов же 3-й группы средние показатели активности СОД и каталазы перед началом лечения были достоверно выше ($p < 0,05$), а ГПО и ГР, наоборот – ниже ($p < 0,05$). После завершения КПТ в 1-й группе активность СОД увеличилась в среднем на 173 %, во 2-й – на 180 % и в 3-й – на 280 %. Активность каталазы в 1-й группе возросла на 41 %, во 2-й – на 40 % и в 3-й – на 56 %. Выявленные изменения активности ферментов АОЗ 2-й линии носили неоднозначный характер: активность ГПО после окончания КПТ в 1-й и 2-й группе повысилась соответственно на 713,5 % и 725,2 % ($p < 0,001$), у пациентов же 3-й группы – лишь на 14,1 % ($p > 0,05$). Подобная ситуация складывалась и при сравнении средних показателей активности ГР: в первых двух группах активность фермента увеличилась на 126 % и на 130 % ($p < 0,001$), в 3-й на 14,6 % ($p > 0,05$). Средние показатели концентрации МДА и ВЭГ перед началом КПТ у наблюдаемых пациентов 1-й и 2-й группы не имели существенных отличий ($p > 0,05$), в 3-й же группе данные показатели были значительно выше ($p < 0,05$). В результате проведенной

антивирусной терапии средняя концентрация МДА в первых двух группах увеличилась соответственно на 9,1 % и 9,3 % ($p>0,05$), а ВЭГ – на 9,1 % и 9,3 % ($p>0,05$). У больных ХГС 3-й группы отмечались гораздо более выраженные изменения данных показателей: МДА увеличился на 92,1 %, а ВЭГ – на 47,4 % ($p<0,001$). Что касается уровня антиэритроцитарных антител, то в 1-й и 2-й группе пациентов перед началом КПТ были обнаружены лица, как с отсутствием, так и с низким и умеренным уровнем фиксированных IgG, при этом существенных отличий их удельного веса между данными группами зафиксировано не было. В 3-й же группе больных ХГС статистически более высоким оказалось относительное количество пациентов с низким и умеренным уровнем антиэритроцитарных IgG, кроме того, были выявлены лица и с высоким уровнем аутоантител. После проведения КПТ в 1-й и 2-й группах больных ХГС достоверно повысился удельный вес пациентов с умеренным, а в 3-й – высоким уровнем антиэритроцитарных IgG. Кроме того, во 2-й группе отмечалось появление лиц с высоким, а в 3-й – крайне высоким уровнем вышеуказанных антител. Средний показатель уровня ЕРО в 1-й группе наблюдаемых лиц перед началом КПТ составил $7,3\pm 1,2$ мЕд/мл, во 2-й – $12,4\pm 2,1$ мЕд/мл и в 3-й – $30,8\pm 5,3$ мЕд/мл. После окончания КПТ средний уровень ЕРО статистически значимо повысился во всех сравниваемых группах. Однако, несмотря на общую направленность выявленных изменений, степень выраженности последних была явно неоднозначна. Так, в 1-й группе больных ХГС средний показатель уровня ЕРО повысился от исходного в 7,7; во 2-й – в 4,3; а в 3-й – всего в 1,9 раза.

Частота встречаемости точковых мутаций Ala16Val (rs4880) и -262C/T (rs1001179) соответственно в генах, ответственных за синтез SOD2 и CAT во всех группах наблюдаемых лиц, не имела достоверных отличий ($p>0,05$). Совсем иная ситуация складывалась с мутацией 718C/T (rs713041) гена GPX4, так в 1-й группе больных ХГС «мутантный» генотип T/T был зафиксирован у $14,3\pm 5,9$ % пациентов, во 2-й группе – у $17,8\pm 6,3$ % и наконец в 3-й – у $78,6\pm 5,3$ % больных ХГС, что оказалось значительно выше нежели у пациентов первых двух групп ($p<0,001$).

Выводы

1. Степень выраженности и сроки развития КПТ-ассоциированной анемии у больных ХГС определены целым рядом факторов, среди которых можно выделить как непосредственное действие HCV, так и индивидуальные характеристики самого пациента.
2. В ходе проведения КПТ у больных ХГС отмечается развитие спленомегалии, увеличение среднего объема и среднего диаметра эритроцитов, развитие абсолютного и относительного ретикулоцитоза, дисбаланс морфологических форм с преобладанием стареющих «предгемолитических» клеток, а также разнообразные ультраструктурные дефекты мембраны и стромы эритроцитов.

3. У больных ХГС, прежде всего, с умеренной и тяжелой степенью КПТ-ассоциированной анемии наблюдаются выраженные нарушения в системе АОЗ эритроцитов, о чем свидетельствуют разнонаправленные изменения активности СОД, каталазы, ГПО и ГР эритроцитов, а также повышение в плазме ПК концентрации таких маркеров ПОЛ, как МДА и ВЭГ.
4. В патогенезе КПТ-ассоциированной анемии существенное место занимают процессы иммунного внесосудистого гемолиза, развитие которого тесным образом связано с повышением в ходе этиотропного лечения HCV уровня антиэритроцитарных IgG, фиксированных на клеточной мембране эритроцитов.
5. Снижение в ПК больных ХГС парциального давления O₂ приводит у данной категории лиц к компенсаторному увеличению выработки эндогенного EPO. В условиях же повышенной нагрузки на систему эритрона, обусловленной приемом противовирусных препаратов, вышеуказанный механизм регуляции эритропоэза становится недостаточно эффективным, что может являться одним из ключевых моментов в патогенезе КПТ-ассоциированной анемии.
6. Развитие у больных ХГС на фоне приема КПТ средней и тяжелой степени анемии ассоциируется с высокой частотой точковой мутации 718C/T(rs713041) в гене, ответственном за синтез GPX4 – фермента, относящегося, как известно, ко 2-й линии антиоксидантной защиты липидных компонентов клеточной мембраны.

Список литературы

1. Амбалов Ю.М., Васильева И.И., Рязанова О.А. и др. Клинико-патогенетические особенности простого герпеса в разные периоды болезни // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 3. – Т. 2. – С. 22-27.
2. Васильева И. И., Донцов Д. В., Кузнецова Г. В., Суладзе А. Г. // 61-я Итоговая науч. конф. молодых ученых: Аннотации докладов и материалов Дня науки Ростов. гос. мед. ун-та. – Ростов-н/Д, 2007. – С. 47-48.
3. Донцов Д. В., Амбалов Ю. М., Алексеева Н. Н. Роль изменений ряда показателей функционального состояния сердечно-сосудистой системы в клинике и патогенезе хронического гепатита С // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2. – С. 290-293.
4. Berry L., Irving W. Predictors of hepatitis C treatment response: what's new? // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2014. – Vol. 12, № 2. – P. 183-191.
5. Flisiak R., Jaroszewicz J., Parfieniuk-Kowerda A. Emerging treatments for hepatitis C // Expert Opinion on Emerging Drugs. – 2013. – Vol. 18, № 4. – P. 461-475.

6. Hashemi N., Rossi S., Navarro V.J. Safety of peginterferon in the treatment of chronic hepatitis C // *Expert Opinion on Drug Safety*. – 2008. – Vol. 7, № 6. – P. 771-781.
7. Loustaud-Ratti V., Rousseau A., Marquet P. Alain Ribavirin in chronic hepatitis C: past and future // *Expert Review of Anti-infective Therapy*. – 2009. – Vol. 7, № 3. – P. 249-253.
8. Suarez A., Redmond D. Desired Social Distance From People Who Have Hepatitis C Virus: An Exploration Among Staff in Health Care, Dentistry, Drug Treatment, and Tattoo/Body Piercing // *Substance Use & Misuse*. – 2014. – Vol. 49, № 4. – P. 466-474.
9. Toyoda H., Kumada T. Pharmacotherapy of chronic hepatitis C virus infection – the IDEAL trial: ‘2b or not 2b (=2a), that is the question’ // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. – 2009. – Vol. 10, № 17. – P. 2845-2857.

Рецензенты:

Николаев Б.Ф., д.м.н., МЛПУЗ «ГБ № 1 им. Н.А. Семашко», г. Ростов-на-Дону.

Яговкин Э.А., д.м.н., Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону.