

УДК 616.988.76-092:616.36-002+615.284

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

**Донцов Д.В., Амбалов Ю.М., Пройдаков М.А., Коваленко А.П.,
Усаткин А.В., Левина Л.Д.**

*Ростовский государственный медицинский университет,
Ростов-на-Дону, e-mail: 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. Формирование данных синдромов зависит от целого ряда факторов. В данной работе изучены некоторые особенности патогенеза тромбоцитопении, 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 клеток крови, определение уровня антитромбоцитарных ауто-IgG, концентрации эндогенного тромбопоэтина и ДНК полиморфизмов гена MPL. В общей сложности, в исследование было включено 228 пациентов, получающих комбинированную противовирусную терапию хронического гепатита С. Работа проводилась на базе кафедры инфекционных болезней РостГМУ.

Ключевые слова: хронический гепатит С, противовирусная терапия, тромбоцитопения

THROMBOCYTOPENIA 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., Projdakov M.A., Kovalenko A.P.,
Usatkin A.V., Levina L.D.**

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, e-mail: d_dontcov@mail.ru

The patients with chronic hepatitis C, are receiving combined anti-virus therapy, have often 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. The development of these adverse effects depends on many factors. In this work we have studied some features of thrombocytopenia pathogenesis at patients with chronic hepatitis C, who receives combined anti-virus therapy. In this situation we executed special researches: automatic hematological analysis, electronic microscopy of blood cells, definition of level auto-antibodies against thrombocytes, concentration of human thrombopoetin, and the DNA polymorphism of MPL-gene. There were 228 patients, who were receiving combined anti-virus therapy of chronic hepatitis C, in this research. This work was made on base for the department of infections diseases Rostov State Medical University.

Keywords: chronic hepatitis C, anti-virus therapy, thrombocytopenia

Хронический гепатит С (ХГС) является одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний человека [6]. Применение современной комбинированной противовирусной терапии (КПТ) ХГС позволяет добиться у многих пациентов полной элиминации возбудителя [3, 4, 5], однако, актуальной проблемой при этом остается развитие нежелательных явлений (НЯ), среди которых особое место занимают гематологические осложнения [1, 7]. Одним из наиболее серьезных гематологических синдромов у больных ХГС является КПТ-ассоциированная тромбоцитопения, развитие которой значительно увеличивает риск возникновения состояний, угрожающих жизни пациентов [1, 2]. К сожалению, многие стороны патогенеза данного НЯ этиотропного лечения хронической HCV-инфекции остаются практически не изученными.

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

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 228 больных ХГС, имевших показания к КПТ. Генотип HCV 1a встречался у 3,5%, 1b – 51,3 %, 3a – 28,9% и 2a – 16,2% человек. Уровень вирусной нагрузки (ВН) у 30,3% пациентов составил $< 3 \times 10^5$ МЕ/мл, у 46,1% – $3 \times 10^5 - 6 \times 10^5$ МЕ/мл и у 23,7% $> 6 \times 10^5$ МЕ/мл. Всем испытуемым была назначена КПТ согласно современным международным стандартам. 51,3% пациентов получали рибавирин в сочетании с пегилированными α -интерферонами (пег-ИНФ- α), 48,7% – в сочетании с «короткими». 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 КПП. Внутриклеточная ультраструктура тромбоцитов ПК изучалась с помощью трансмиссионной электронной микроскопии на просвечивающем электронном микроскопе «Теспаи G² Spirit BioTWIN» (Philips, Нидерланды). Уровень человеческого тромбопоэтина (THPO) исследовали методом твердофазного ИФА с использованием набора реактивов Human Thrombopoietin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, США) на спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США). Определение антител к поверхностным антигенам (GP IIa-IIIb) базальной мембраны тромбоцитов в сыворотке крови осуществляли путем постановки реакции непрямой иммунофлюоресценции. При этом использовались диагностические наборы «Thrombocytes IIFT» (EUROIMMUN AG, Германия) с мечеными ФИТЦ вторичными антителами к антитромбоцитарным IgG человека. Характер флуоресцентного свечения оценивался на микроскопе Olympus CX41 (Япония). Результат реакции выражался в титрах. Перечисленные выше методы исследования проводились дважды: перед началом и сразу после завершения или вынужденного прекращения КПП. Помимо этого у испытуемых лиц методом «ПЦР в реальном времени» было выполнено изучение однонуклеотидных ДНК-полиморфизмов (SNP) гена рецептора тромбопоэтина MPL, в частности частота точковых мутаций W515L/K (rs121913615/121913616). 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 исследования и их обсуждение

В результате проведенного лечения УВО в общей сложности был достигнут у 155 (68,0%) пациентов, из них 64 (41,3%) были инфицированы 1-м; 34 (21,9%) – 2-м и 57 (36,8%) – 3-м генотипами HCV. Среди получавших пег-ИФН- α -2а (n = 117) частота УВО составила 54,7% (n = 64); получавших «короткие» ИФН- α (n = 111) – 82,0% (n = 91). У больных, инфицированных 1-м генотипом HCV (n = 125), УВО отмечался в 51,2% (n = 64) случаев; у инфицированных 2-м (n = 37) и 3-м (n = 66) генотипами HCV – в 91,9% (n = 34) и 86,4% (n = 57) случаев соответственно. Проведение КПП прекращалось при отсутствии через 12 недель лечения РВО и/или развитии у пациентов тяжелых НЯ противовирусной терапии. В итоге, из 228 больных ХГС полностью закончили курс КПП 163 человека (71,5%). У 8 пациентов (3,5%) терапия была отменена уже через 8 недель лечения исключительно по причине развития тяжелых гематологических осложнений КПП. У 57 больных ХГС (25,0%) было зафиксировано отсутствие РВО, причем у 9 из них (3,9%) параллельно наблюдалось развитие к 12-й неделе КПП тяжелых осложнений со стороны системы крови, также требовавших отмены терапии.

При изучении степени тяжести КПП-ассоциированной тромбоцитопении нами была использована классификация Всемирной организации здравоохранения, согласно которой выделяют легкую ($Tr\ 150\text{--}75\times 10^9/l$), умеренную ($Tr\ 74\text{--}50\times 10^9/l$) и тяжелую ($Tr < 50\times 10^9/l$) степени тромбоцитопении. В результате было установлено, что на разных этапах КПП тромбоцитопения в общей сложности развивалась у 30,3% пациентов, при этом легкая степень отмечалась у 16,2%; умеренная – у 10,5% и тяжелая – у 3,5% больных ХГС.

Объективные изменения в виде геморагий в местах инъекций, появления петехиальной сыпи на нижних конечностях, частых носовых кровотечений, гематурии были выявлены исключительно у лиц с умеренной и тяжелой степенью тромбоцитопении. У 21,4% пациентов, начиная с 20 недели КПП, было зафиксировано развитие спленомегалии.

Легкая степень тромбоцитопении через 4 недели КПП была зафиксирована у 8,3%, через 8 недель – у 11,8%, через 12 – у 15,0%, через 24 – у 29,4% и через 48 (пациенты с 1-м генотипом HCV) – у 34,8% больных ХГС. Умеренная степень тромбоцитопении через 12 недель КПП отмечалась у 1,4% больных ХГС, через 24 недели – у 8,0% и через 48 недель – у 11,1% пациентов. Развитие тромбоцитопении тяжелой степени было выявлено у 3,6% больных ХГС через 12 недель лечения, совпав при этом с отсутствием РВО у данной категории лиц (табл. 1).

Все участники исследования в зависимости от минимального количества тромбоцитов, зафиксированного у каждого пациента за весь период КПП (Tr_{min}), были разделены на три группы. В 1-ю группу (n = 159) вошли лица, у которых Tr_{min} на протяжении КПП оставался в пределах допустимой нормы, т.е. $> 150\times 10^9/l$. 2-я группа (n = 37) включала больных ХГС с легкой степенью КПП-ассоциированной тромбоцитопении: Tr_{min} в пределах $75\text{--}150\times 10^9/l$. 3-ю группу (n = 32) составили лица с умеренной и тяжелой степенью тромбоцитопении: $Tr_{min} < 75\times 10^9/l$. Средний показатель Tr_{min} в 1-й группе оказался равен $176,03 \pm 2,77$; во 2-й – $127,89 \pm 3,45$ и в 3-й – $64,69 \pm 2,03\times 10^9/l$.

Проведенный корреляционный анализ позволил установить наличие умеренной обратной ассоциативной связи между Tr_{min} и такими исходными показателями пациентов как возраст, индекс массы тела (ИМТ), величина ВН и индекс фиброза (ИФ), что же касается количества Tr перед началом КПП, то в данном случае была получена сильная прямая ассоциативная связь (табл. 2).

Таблица 1

Характер распределения больных ХГС в зависимости от количества тромбоцитов перед началом КПП, через 4, 8, 12, 24, 48 недель от начала КПП и через 24 недели после окончания КПП

Тр. ($\times 10^9/\text{л}$)	Абсолютное (n) и относительное (%) число больных ХГС						
	перед КПП (n = 228)	4 недели КПП (n = 228)	8 недель КПП (n = 228)	12 недель КПП (n = 220)	24 недели КПП (n = 163)	48 недель КПП (n = 72)	24 недели после КПП (n = 221)
> 150	225 (98,7%)	209 (91,7%)	201 (88,2%)	176 (80,0%)	102 (62,6%)	39 (54,1%)	209 (94,6%)
150–75	3 (1,3%)	19 (8,3%)	27 (11,8%)	33 (15,0%)	48 (29,4%)	25 (34,8%)	12 (5,4%)
75–50	0	0	0	3 (1,4%)	13 (8,0%)	8 (11,1%)	0
< 50	0	0	0	8 (3,6%)	0	0	0

Таблица 2

Характер корреляционных связей $\text{Tr}_{\min}$ с возрастом, ИМТ, количеством Тр, величиной ВН и ИФ перед КПП у наблюдаемых нами больных ХГС

Исследуемый показатель	Возраст пациентов		ИМТ перед КПП		Количество Тр перед КПП		ВН перед КПП		ИФ перед КПП	
	г	р	г	р	г	р	г	р	г	р
$\text{Tr}_{\min}$	-0,28	< 0,01	-0,31	< 0,01	0,65	< 0,01	-0,35	< 0,01	-0,27	< 0,01

На старте КПП среди пациентов 3-й группы в сравнении с 1-й и 2-й преобладали лица старше 40 лет, имеющие ИМТ > 25 и ИФ F2-3 ($p < 0,05$). Перед началом КПП средний показатель количества Тр в 1-й группе больных ХГС составил $260,83 \pm 3,96$; во 2-й – $218,46 \pm 5,73$ и в 3-й – $180,78 \pm 3,76 \times 10^9/\text{л}$ (во всех случаях $p > 0,05$). Уже через 4 недели терапии отмечалось достоверное снижение среднего показателя количества Тр у пациентов всех групп ($p > 0,05$), минимальные же значения данного показателя были зафиксированы в период с 24-й по 48-ю недели КПП. В целом же, наиболее выраженные изменения на всех этапах лечения отмечались в 3-й группе больных ХГС ($p < 0,05$). Что касается среднего объема Тр, то в процессе КПП отмечалось статистически значимое ($p < 0,05$) повышение среднего показателя MPV, наиболее выраженное опять-таки у пациентов 3-й группы.

В ходе исследования во всех сравниваемых группах были выявлены пациенты с разнообразными структурными дефектами как цитоплазматической мембраны тромбоцитов (участки локального разрыхления, патологические выпячивания, микро- и макроvesикулообразование), так и их стромы (образование полостей и эндовезикул, гипертрофия грануломера, отек и набухание митохондрий) (рис. 1, 2).

Как показал сравнительный анализ, на старте лечения в 3-й группе пациентов гораздо чаще встречались лица с вышеуказан-

ными дефектами. После завершения КПП удельный вес больных ХГС с выявленными структурными изменениями тромбоцитов либо имел тенденцию к снижению, либо достоверно снижался во всех группах ($p < 0,05$), оставаясь, тем не менее, наиболее высоким в 3-й группе.

Что касается уровня антиромбоцитарных антител, то в 1-й и 2-й группе пациентов перед началом КПП были обнаружены лица с отсутствием, а также с низким и умеренным уровнем IgG к поверхностным антигенам GP IIa-IIIb, 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 антиромбоцитарных IgG. После КПП в 1-й группе удельный вес пациентов с выявленным уровнем антиромбоцитарных IgG существенно не изменился, во 2-й – достоверно повысился удельный вес больных с умеренным, а в 3-й – с высоким уровнем антиромбоцитарных IgG, кроме того, в 3-й группе отмечалось появление пациентов с крайне высоким уровнем антиромбоцитарных IgG.

Средний показатель уровня ТНРО перед началом КПП в 1-й группе наблюдаемых нами лиц составил $24,43 \pm 1,1$ пг/мл, во 2-й – $25,77 \pm 0,97$ пг/мл, в 3-й же группе данный показатель оказался достоверно выше – $29,08 \pm 1,01$ пг/мл ($p < 0,05$). После

окончания КПТ средний уровень ТНРО статистически значимо повысился лишь в 1-й

и 2-й группах, тем самым достоверно превысив таковой у пациентов 3-й группы.

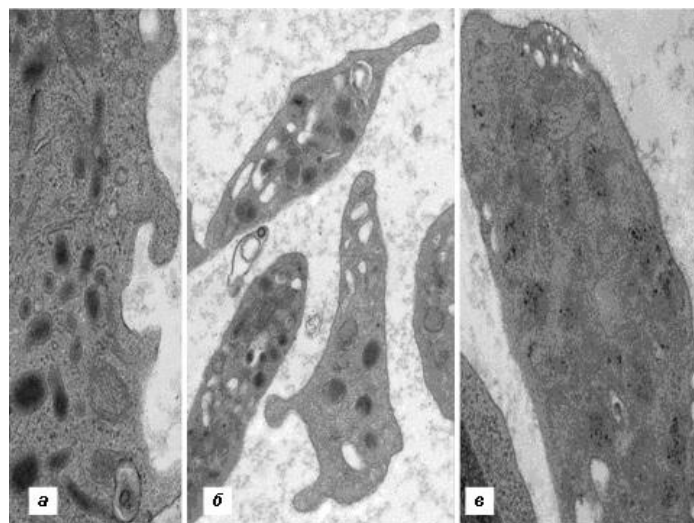


Рис. 1. Признаки деструкции плазмолеммы тромбоцитов, выявленные у наблюдаемых пациентов. Трансмиссионная электронная микроскопия: а – локальные участки истончения и разрыхления ($\times 58\,000$); б – патологические выпячивания плазмолеммы ($\times 22\,000$); в – образование микро- и макровезикул ($\times 36\,000$)

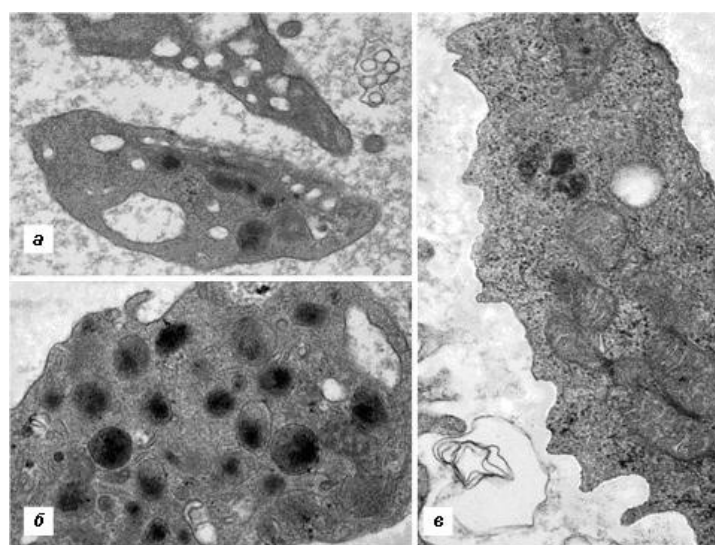


Рис. 2. Признаки деструкции цитоплазмы тромбоцитов, выявленные у наблюдаемых пациентов. Трансмиссионная электронная микроскопия: а – тромбоциты с множественными эндовезикулами ($\times 22\,000$); б – гипертрофия грануломера ($\times 44\,000$); в – отек и набухание митохондрий ($\times 38\,000$)

Частота встречаемости точковой мутации W515L (rs121913615) гена MPL в 1-й группе больных ХГС составила $27,8 \pm 7,5\%$ пациентов, во 2-й группе – $22,6 \pm 7,5\%$ и наконец в 3-й – $71,9 \pm 7,9\%$ человек, что оказалось значительно выше нежели у пациентов первых двух групп ($p < 0,001$). Совсем иная ситуация складывалась с мутацией W515K (rs121913616), в данном случае «мутантный» генотип был зафиксирован в 1-й и во 2-й группах больных ХГС в

$16,7 \pm 6,2\%$, и $16,1 \pm 6,6\%$ случаев соответственно ($p > 0,05$), в 3-й же группе данная мутация выявлена не была.

Выводы

1. Степень выраженности КПТ-ассоциированной тромбоцитопении у больных ХГС определена целым рядом факторов, среди которых можно выделить как непосредственное действие HCV, так и индивидуальные характеристики самого пациента.

2. Перед началом противовирусного лечения у больных ХГС имеются разнообразные ультраструктурные дефекты мембраны и стромы эритроцитов, которые, вполне возможно, могут играть важную роль в развитии КПТ-ассоциированной тромбоцитопении.

3. В патогенезе КПТ-ассоциированной тромбоцитопении существенное место занимает повышение уровня антитромбоцитарных аутоантител к поверхностным антигенам GP IIa-IIIb.

4. В процессе антивирусной терапии у лиц с отсутствием или же легкой степенью КПТ-ассоциированной тромбоцитопении происходит компенсаторное увеличение выработки эндогенного ТНРО, что вполне обеспечивает адекватный уровень тромбоцитопоза у данной категории лиц.

5. Развитие у больных ХГС средней и тяжелой степени КПТ-ассоциированной тромбоцитопении ассоциируется с высокой частотой точковой мутации W515L (rs121913615), происходящей в структуре гена MPL, ответственного, как известно, за синтез R эндогенного ТНРО.

Список литературы/References

1. Adinolfi L.E., Giordano M.G., Andreana A. Hepatic fibrosis plays a central role in the pathogenesis of

thrombocytopenia in patients with chronic viral hepatitis // Br. Journal Haematology. – 2001. – Vol. 113. – pp. 590–595.

2. Afdhal N., McHutchison J., Brown R. Thrombocytopenia associated with chronic liver disease // Journal Hepatology. – 2008. – Vol. 48. – pp. 1000–1007.

3. Berry L., Irving W. Predictors of hepatitis C treatment response: what's new? // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2014. – Vol. 12, no. 2. – pp. 183–191.

4. Flisiak R., Jaroszewicz J., Parfieniuk-Kowerda A. Emerging treatments for hepatitis C // Expert Opinion on Emerging Drugs. – 2013. – Vol. 18, no. 4. – pp. 461–475.

5. 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, no. 6. – pp. 771–781.

6. 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, no. 4. – pp. 466–474.

7. 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. – pp. 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.

Работа поступила в редакцию 07.08.2014.