

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
КОМОРБИДНОСТИ У БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С
ОКСИДАТИВНЫМ СТРЕССОМ**

Каргин В.Д., Солдатенков В.Е., Капустин С.И., Чечеткин А.В., Бессмельцев С.С., Бураков
В.В., Рыбакова Л.П., Алексанян Л.Р., Шмелева В.М., Смирнова О.А., Папаян Л.П., Титов
А.Г., Комиссаров К.А.

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»

Резюме.

Представлены результаты исследования коморбидности у больных с тяжелым течением гемофилии, связанные с метаболическими нарушениями гомоцистеина и экспрессией оксидативной агрессии. Изучена частота гипергомоцистеинемии – индуктора окислительного стресса, состояние антиокислительной защиты, как патогенетических механизмов, участвующих в прогрессировании суставной болезни у больных гемофилией. На основании данных генетических и биохимических исследований дано обоснование генеза гипергомоцистеинемии и оксидативных нарушений как коморбидных состояний у больных гемофилией, а также определены предикторы указанных патологических состояний

Ключевые слова: гемофилия, генетические маркеры, прогностические факторы, гипергомоцистеинемия, коморбидность,

**GENETIC MARKERS AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE
COMORBIDITY IN PATIENTS WITH SEVERE HEMOPHILIA, ASSOCIATED WITH
OXIDATIVE STRESS**

Kargin V.D., Soldatenkov V.E., Kapustin S.I., Chechetkin A.V., Bessmeltsev S.S., Burakov V.V.,
Rybakova L.P., Aleksanyan L.R., Shmeleva V.M., Smirnova O.A., Papayan L.P., Titov A.G.,
Komissarov K.A.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St-Petersburg, Russia

e-mail: RNIHT@mail.ru

Resume: The results of the study of comorbidity in patients with severe hemophilia, associated with metabolic disorders of homocysteine and expression of oxidative aggression, are presented. The frequency of hyperhomocysteinemia as an inducer of oxidative stress, as well as condition of

lipid peroxidation and antioxidative protection, involved in the progression of joint disease in patients with hemophilia, have been studied. Based on genetic and biochemical data, the origin of hyperhomocysteinemia and oxidative disorders and their role in comorbidity in patients with severe hemophilia has been established, as well as the predictors of those disorders were identified.

Keywords: hemophilia, genetic, prognostic factor, hyperhomocysteinemia, comorbidity

Введение. Профилактика и лечение хронических заболеваний, коморбидности обозначены Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как приоритетный проект второго десятилетия XXI века, направленный на улучшение качества жизни населения мира [1, 2, 3].

Влияние коморбидности на клиническое течение основного соматического заболевания, эффективность медикаментозной терапии является предметом изучения многих исследователей [4,5].

Наличие коморбидности следует учитывать при выборе алгоритма диагностики и схем лечения той или иной болезни. При этом важно знать, имеется или отсутствует патогенетическая взаимосвязь событий и патофизиологических состояний, часто имеющая характер взаимоотягощения. Гемофилия – генетически обусловленное заболевание, но как показали ряд исследователей, у пациентов с указанной патологией с более высокой частотой выявляется хронический вирусный гепатит, язвенная болезнь желудка, хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь, железодефицитная анемия, артериальная гипертензия, чем в общей популяции [6, 7].

Этиология и патогенез развития перечисленной сопутствующей патологии у больных гемофилией в настоящее время не находит единого объяснения. Несомненно, профилактическая заместительная терапия повысила качество жизни пациентов с гемофилией. Применение высокоочищенных концентратов факторов свертывания крови VIII/IX снизило риск развития геморрагических осложнений, расширило возможность социальной адаптации и повысило качество жизни. Но в то же время как у пожизненно трансфузируемых лиц, у пациентов с наследственным дефицитом факторов свертывания сохраняется опасность иммунологических и гемотрансмиссивных осложнений. Практически 100% пациентов с тяжелым течением гемофилии являются инвалидами по болезни, что обусловлено специфическим поражением суставов – гемофилической полиартропатией. Рецидивирующие микрокровоизлияния, связанные с недостаточно адекватным персонифицированным обеспечением препаратами дефицитных факторов, провоцируют

вероятность развития оксидативных нарушений в суставных тканях. Поэтому актуальным является изучение состояния антиокислительной защиты у данной категории больных, определение прогностических критериев риска развития указанных коморбидных состояний, последующей разработки рекомендаций по их профилактике и лечению.

Доказанным индуктором оксидативной агрессии у больных гемофилией следует считать дериваты железа (гемосидерин) эритроцитов, лизирующихся в очаге кровоизлияния [8]. Рецидивирующие микрогеморрагии в суставные и другие ткани хронически поддерживают процесс асептического воспаления с пролиферативным эффектом для синовиальной оболочки, усиливая деструктивные изменения в костных, хрящевых и мягкотканых структурах сустава. Другим системным инициатором свободнорадикального стресса при данной патологии может быть гипергомоцистеинемия (ГГЦ), вероятность которой ассоциируется с частой встречаемости гепатита С (или носительства вируса гепатита С) у данной категории пациентов и изменениями обмена гомоцистеина в печени. Заслуживает внимания изучение генетической детерминации метаболических нарушений, которые могут приводить к возникновению сопутствующей патологии (коморбидности) у больных с тяжелым течением гемофилии.

В статье представлены результаты исследования по данной проблематике.

Материалы и методы. Объектом исследования явилась группа из 70 пациентов (с гемофилией А – 65 человек, с гемофилией В – 5 человек). Средний возраст составил 35,5 лет (от 18 до 65 лет), с преобладанием частоты госпитализаций в возрасте до 40 лет у 61,7% пациентов. Тяжелая форма заболевания (активность фактора VIII/IX < 1%) была установлена у 94% больных, средне-тяжелая (активность фактора VIII/IX выше 1%) – у (6%). У всех больных выявлена артропатия крупных суставов с проявлениями деформирующего артроза преимущественно коленных (86%), голеностопных (89%), локтевых (51%), плечевых (39%). Характерным для больных, вошедших в исследование, было сочетанное поражение нескольких суставов – полиартропатия, выявленная у 97% обследованных. Большинство больных находились на профилактической заместительной терапии, несмотря на которую у 95% из них наблюдались рецидивирующие гемартрозы с частотой от 5 до 12 в год. Основная причина для госпитализации – обострение суставных болей и повторные кровоизлияния в суставы. Пациенты, имевшие инвалидность (ограничение трудоспособности), составили 91%, что подчеркивает неадекватность заместительной профилактической терапии и тяжесть течения заболевания. Контрольную группу (КГ) составили 255 здоровых мужчин, соответствующих по возрасту исследуемой группе.

Всем пациентам проводилась комплексная клиническая, лабораторная (коагулологическая, серологическая, биохимическая, молекулярно-генетическая) и инструментальная (рентгенография крупных суставов, ультразвуковое сканирование печени, почек, мочевыводящих путей) диагностика.

Оценку свободнорадикального окисления и антиоксидантной активности определяли стандартными биохимическими методами [9]. О выраженности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке больных судили по содержанию вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА), определяемого колориметрическим методом по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой. О состоянии антиоксидантной системы (АОС) судили по активности компонентов первичной защиты супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Активность суммарной СОД плазмы оценивали по степени торможения реакции окисления кверцетина. Активность КАТ в сыворотке определяли на основании способности разлагать перекись водорода, о чем судили по величине неутилизированной перекиси водорода, образующей стойкий окрашенный комплекс с солями молибдата аммония. Содержание низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов определяли по количеству небелковых тиоловых групп (НТГ) эритроцитов, около 90% которых принадлежит восстановленному глутатиону.

Исследование уровня гомоцистеина в плазме проводили на автоматическом коагулометре ACL TOP 300 (Instrumentation Lab., Италия) с использованием оригинальных реактивов. Наличие антител класса IgG к вирусу гепатита С (HCV) определяли иммуноферментным методом.

С помощью метода ПЦР и последующего рестрикционного анализа проводили генотипирование полиморфизма генов метилентетрагидрофолат редуктазы (MTHFR C677T), аполипопротеина Е (ApoE e2/e3/e4), параоксоназы (PON1 Gln192Arg), каталазы (CAT C-262T) и плазменной глутатион пероксидазы (GPX3 T-65C). Статистические различия в распределении генотипов между группой больных и КГ оценивали с помощью точного метода Фишера. Для расчета коэффициента «отношения шансов» (OR) с 95% доверительным интервалом (CI) и р-значения применялся статистический пакет GraphPad Prism 4.0.

Результаты и обсуждение. В связи с тем, что гипергомоцистеинемия у больных с тяжелым течением гемофилии может быть обусловлена метаболическими нарушениями, ассоциированными с гепатитом С, мы исследовали частоту встречаемости повышенного уровня гомоцистеина в анализируемой группе пациентов. Результаты представлены в таблице 1.

Результаты исследования показали, что у 34,2% обследованных больных с тяжелым течением гемофилии уровень гомоцистеина был повышен. Одновременно выявлена высокая частота встречаемости маркеров вируса гепатита С (гепатит С с минимальной активностью) у этих пациентов – 75,0% против 57,7% у лиц с нормальным уровнем гомоцистеина (ГЦ), что дает основание предполагать метаболический генез гипергомоцистеинемии.

Таблица 1 – Уровень гомоцистеина и частота выявления антител к HCV у больных гемофилией

Группы больных (N=70)	n/%	Уровень гомоцистеина (M±m) [норма 4-13,5 мкмоль/л]	Носительство вируса гепатита С, n (%)
Группа с нормальным уровнем гомоцистеина	46/65,7%	10,9 ±0,3	26 (57,7)
Группа с гипергомоцистеинемией	24/34,2%	**17,4±0,8	18 (75)

** - статистически значимое различие между группами (p<0,05)

Чтобы оценить возможное значение генетической составляющей в развитии ГГЦ, нами проведено изучение частоты полиморфизма С677Т гена метилентетрагидрофолат редуктазы (МТГФР) в исследуемой группе больных. Установлено, что частота изоформы С677Т у больных с ГГЦ составляет 75% против 36,9%, что указывало на генетическую нагрузку как предиктора возможной экспрессии гипергомоцистеинемии у больных с тяжелым течением заболевания.

Выявленные коморбидные состояния – гипергомоцистеинемия, носительство вируса гепатита С и полиартропатия крупных суставов с рецидивирующими микрогемартрозами у больных с тяжелой формой гемофилии могут индуцировать свободнорадикальное окисление липидов и белков тканей. Для подтверждения высказанного предположения нами были исследованы особенности окислительных реакций в группе больных с ГГЦ по уровню промежуточного продукта пероксидации липидов – малонового диальдегида (МДА) и параметрам антиоксидантной защиты у больных с тяжелой формой гемофилии. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, у больных с ГГЦ уровень МДА на 60% выше по сравнению с нормой: $17,6 \pm 1,4$ мкмоль/л против нормы $11,0 \pm 0,9$ ($p < 0,05$). Этот факт дает основание заключить, что на фоне хронического течения заболевания (отсутствие на момент исследования острых геморрагических эпизодов) возможной причиной активации окислительных реакций у пациентов с гемофилией является повышенный уровень гомоцистеина. Отмечается несбалансированность антиокислительной системы АОС больного, что проявляется снижением коэффициента СОД/КАТ до 10, по сравнению с 21 в норме.

Таблица 2 – Показатели окислительной и антиоксидантной систем

	n	МДА (ммоль/л), M $\pm$ m	СОД (усл. ед. акт.), M $\pm$ m	КАТ (усл. ед. акт.), M $\pm$ m	Коэф- фициент СОД/КАТ	НТГ (ммоль/л), M $\pm$ m
Контрольная группа	50	$11,0 \pm 0,9$	$39,0 \pm 2,0$	$1,9 \pm 0,2$	21	$0,34 \pm 0,02$
Группа больных с ГГЦ	23	$17,6 \pm 1,4^{**}$	$49,7 \pm 3,3^{**}$	$7,3 \pm 1,9$	$10,7^{**}$	$0,20 \pm 0,03$

** – статистически значимые различия по сравнению контролем ($p < 0,05$)

Кроме того, наблюдалась тенденция к снижению активности глутатионпероксидазы по уровню содержания НТГ ($0,2 \pm 0,03$ против $0,34 \pm 0,02$ в норме), являющихся важнейшим компонентом АОС ряда тканей, что указывает на усиленное потребление восстановленного глутатиона НТГ при детоксикации свободных радикалов у больных гемофилией с ГГЦ.

Для понимания механизма окислительного стресса у больных гемофилией представляется важным изучение его возможной генетической детерминации. Этот вопрос актуален, во-первых, с точки зрения разработки методов профилактики и лечения метаболических нарушений и, во-вторых, с позиций определения предикторов риска их возникновения. Были дополнительно изучены особенности аллельного полиморфизма некоторых генов, ассоциированных с развитием окислительного стресса, у 71 больного с тяжелым течением гемофилии. Результаты представлены в таблице 3.

Установлено необычное распределение генотипов ApoE в группе больных. Отсутствие аллеля e3 наблюдалось у 7 (9,9%) пациентов, что более чем в 3 раза превышало

соответствующий показатель в контроле – 3,1% (OR=3,4; 95% CI: 1,2-9,7; p=0,025). Частота встречаемости генотипа ApoE e2/e2 была в 10 раз выше в группе больных (4,2% против 0,4% в КГ, OR=11,2; 95% CI: 1,1-109,5; p=0,034). Варианты ApoE e2/e4 и e4/e4 также чаще встречались среди больных, чем в группе здоровых лиц (2,8% против 0,8% и 2,8% против 2,0% соответственно).

Таблица 3 – Распределение генотипов изученных генов у больных с тяжелой формой гемофилии и в контрольной группе.

Ген, полиморфизм	Генотип	Частота встречаемости генотипа, %	
		Больные гемофилией (n=71)	Здоровые мужчины (n=255)
MTHFR, 677 C/T	677 (C/C)	42,2	48,9
	677 (C/T)	49,3	40,8
	677 (T/T)	8,5	10,3
PON1, 192 Gln/Arg	192 Gln/Gln	46,5	49,4
	192 Gln/Arg	40,8	40,3
	192 Arg/Arg	12,7	10,3
GPX3, -65 T/C	-65 (T/T)	67,6	74,9
	-65 (T/C)	31,0	24,6
	-65 (C/C)	1,4	0,5
Catalase, -262 C/T	-262 (C/C)	62,0	65,4
	-262 (C/T)	33,8	29,4
	-262 (T/T)	4,2	5,2
ApoE, E2/E3/E4	E2/E2	4,2	0,4
	E2/E3	16,9	18,4
	E2/E4	2,8	0,8
	E3/E3	60,6	61,6
	E3/E4	12,7	16,8
	E4/E4	2,8	2,0

Кроме того, в группе больных была обнаружена положительная ассоциация между вариантом PON1 192Arg/Arg и гетерозиготным генотипом GPX3 -65TC (OR=5,8; 95% CI: 1,3-25,7; p=0,021). Сочетание указанных генотипов PON1 и GPX3 более чем в 5 раз чаще обнаруживалось в группе больных, чем в контрольной группе (8,5% против 1,6% соответственно, OR=5,5; 95% CI: 1,3-22,8; p=0,016).

Полученные данные свидетельствуют о том, варианты генов ApoE, PON1 и GPX3, ассоциированные с развитием оксидативных нарушений, играют важную роль в диагностике данных коморбидных состояний в качестве предикторов у больных с тяжелой формой гемофилии.

Таким образом, у пациентов с гемофилией, осложненной полиартропатией, выявляется неблагоприятный коморбидный фон, как в виде поражения печени вирусом гепатита С, так и возникновением гипергомоцистеинемии и оксидативных нарушений.

ВЫВОДЫ

1. Гипергомоцистеинемия у 34,2% больных с тяжелой формой гемофилии сопровождается активацией перекисного окисления липидов и дисбалансом антиоксидантной системы.
2. Предикторами риска оксидативных нарушений и гипергомоцистеинемии у больных с тяжелым течением гемофилии могут служить носительство полиморфизмов генов МТГФР С677Т, пароксаназы PON A192G и глутатионпероксидазы GPX3Т65С. Высокая частота встречаемости аллеля МТГФР 677Т у больных гемофилией с гипергомоцистеинемией свидетельствует о значительном вкладе генетической составляющей в увеличении риска оксидативных нарушений и гипергомоцистеинемии в указанной группе.
3. Варианты генов ApoE, PON1 и GPX3, ассоциированные с развитием оксидативных нарушений, играют важную роль в патогенезе коморбидных состояний и могут использоваться в качестве предикторов их развития, требующих медикаментозной коррекции, у больных с тяжелой гемофилией.

Литература

1. Starfield B., Lemke K.W., Bernhardt T. Comorbidity: Implications for the Importance of Primary Care in Case Management // Ann Fam Med, 2003; 1(1):8-14. [Ann Fam Med, 2003; 1\(1\):8-14.](#)
2. Van Weel C., Schellevis F.G. Comorbidity and guidelines: conflicting interests // Lancet, 2006; 367:550-551.
3. Gill T., Feinstein A.R. A critical appraisal of the quality of life measurements // JAMA, 1994; 272: 619-626.
4. Van den Akker M., Buntinx F., Roos S., Knottnerus J.A. Comorbidity or multimorbidity: what's in a name? A review of the literature // Eur J Gen Pract, 1996; 2(2):65-70.
5. Беялов Ф. И. Лечение внутренних болезней в условиях коморбидности // Монография;

2-е изд., Иркутск, 2010.

6. И.А. Блажиевич Клинические особенности, коморбидность и эффективность терапии гемофилии// Автореф. дисс.... канд. мед. наук – Новосибирск. 2009. С.25.
7. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Ультразвуковая диагностика. Санкт-Петербург, Издательство KN. –1997. – С.114-119.
8. G. Roosendaal, M.E. Vianen, M.J.G. Wenting et al. Iron deposits and catabolic properties of synovial tissue from patients with hemophilia // J Bone Joint Surg. Br. –1998. – Vol. 80. – P. 540-545.
9. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Методические рекомендации. – СПб: ИКФ «Фолиант», 2000. – 104 С.