

На правах рукописи

Немцова Елена Геннадьевна

**СИНДРОМ ЖИЛЬБЕРА: КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ,
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ,
ВЯЗКОЭЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ**

14.01.04- Внутренние болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск - 2016 год

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины».

Научные руководители:

Доктор медицинских наук,
Профессор

Курилович Светлана Арсентьевна

Научный консультант:

Доктор медицинских наук

Кручинина Маргарита Витальевна

Официальные оппоненты:

Цуканов Владислав Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий клиническим отделением патологии пищеварительной системы у взрослых Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера». Главный гастроэнтеролог, гепатолог Сибирского федерального округа (СФО).

Гаскина Тамара Константиновна – доктор медицинских наук, гастроэнтеролог Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Новосибирской области "Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр".

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.029.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» (630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова 175/1)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины», [www. iimed.ru](http://www.iimed.ru).

Дата рассылки автореферата диссертации «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 001.029.01,
доктор медицинских наук

Кузнецов Александр Александрович

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Синдром Жильбера (СЖ) – наследственное аутосомно-доминантное заболевание с неполной пенетрантностью, которое характеризуется перемежающейся неконъюгированной гипербилирубинемией при отсутствии гепатоцеллюлярного повреждения печени.

СЖ лидирует по частоте и является наиболее мягким клиническим вариантом среди наследственных неконъюгированных гипербилирубинемий.

Причиной СЖ является инсерция (вставка) дополнительного динуклеотида в области ТА повтора в промоторном регионе гена UGT1A1 (2q37), кодирующего фермент уридиндифосфатглюкуронилтрансферазу (UGT), т.е. мутация rs 8175347 (UGT1A1*28 полиморфизм) (Bosma P.J., Seppen J., Goldhoorn B. et al., 1994). Предпочтительным субстратом для этого фермента является билирубин, но он имеет, хотя и невысокое, сродство с простыми фенолами, флавоноидами и C18-стероидами (Bosma P.J., Seppen J., Goldhoorn B. et al., 1994; Strassburg, C. P., Oldhafer et al., 1997). Шесть повторов ТА в области промотора A(TA)₆ТАА соответствуют нормальной функциональной активности фермента UGT. При вставке седьмого ТА повтора A(TA)₇ТАА ухудшается связывание с транскрипционным фактором, в результате чего уменьшается экспрессия гена, что ведет к снижению функциональной активности фермента, которая проявляется непрямой (неконъюгированной) гипербилирубинемией. При наличии вставки ТА в гомозиготном состоянии наблюдается снижение активности фермента на 30% и конъюгации билирубина в гепатоцитах на 80% по отношению к норме (Jirásková A., Novotný J., Novotný L. et al., 2012). Тенденция к прогрессирующему снижению активности фермента также отмечается при увеличении ТА повторов, например, до 8 (Faragó V., Melegh V., 2008).

Синдром Жильбера в России изучен у взрослых недостаточно, выполненные работы оставляют ряд вопросов (Дубровина Г.М., Ботвиньев О.К., Колотилина А.И., 2014; Ильченко Л.Ю., Дроздов В.Н., Шулятьев И.С. и др., 2006; Рейзис А.Р., 2012). Неясна частота гомо- и гетерозиготного носительства аллели UGT1A1*28. Неясно, только ли в гомозиготном состоянии появляются клинические и лабораторные признаки дефицита UGT1A1? Каково влияние других полиморфизмов UGT1A, часто параллельно выявляемых? Не случайно желтуху при синдроме Жильбера называют только «вершиной айсберга». Формируется мнение, что UGT1A1*28 полиморфизм является биомаркером мультифакториальных заболеваний и нарушений лекарственного метаболизма (Strassburg, C. P., Oldhafer, 1997).

Основным клиническим проявлением синдрома Жильбера является умеренная или слабая желтуха, как правило усиливающаяся при физическом и эмоциональном утомлении, приеме ряда медикаментов, голодании, инфекциях. Однако, часто у этих пациентов описывают разнообразные проявления диспепсии, астении, признаки ДСТ, изменения со стороны

красной крови. Нередко описываются увеличение печени и селезенки, но к сожалению, без адекватного объяснения этих нарушений.

Изменения со стороны красной крови замечены начиная со времени описания синдрома: упоминается увеличение относительной массы эритроцитов, уровня гемоглобина, гематокрита (Buyukasik Y., Akman U., Buyukasik N.S., Goker H. et al., 2008), изменение в липидах мембран эритроцитов (Brito M.A., 2006), снижение их резистентности и т.д. Однако только генетический дефект глюкуронизации билирубина не может объяснить эти изменения эритроцитов. Описаны случаи одновременного наличия СЖ и наследственных дефектов эритроцитов (например, наследственного микросфероцитоза, дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) (Garg P.K., Kumar A., 2008; Kaneko J., Sugawara Y., Maqsoo Y. et al., 2006). Логично ожидать, что сопутствующий синдрому Жильбера наследственный микросфероцитоз будет приводить к большему увеличению неконъюгированного билирубина, повышению риска образования желчных камней и гемолитических кризов. В то же время, эритроциты являются объектом, доступным для изучения и традиционно используются в качестве модели для изучения других клеточных мембран («зеркало мембран», Геннис Г., 1997) и поэтому их изучение при синдроме Жильбера представляет особый интерес.

Пилотное исследование эритроцитов (диэлектрофорез в неоднородном переменном электрическом поле), выполненное ранее у пациентов с предполагаемым синдромом Жильбера (но без генетического подтверждения) (Кручинина М.В., 2009), показало гетерогенность этой группы по некоторым эритроцитарным характеристикам, что требовало дальнейших исследований.

Степень разработанности темы

Современные зарубежные публикации преимущественно посвящены генетике синдрома Жильбера. Общепринятым является представление о том, что генетической основой синдрома Жильбера является ТА-полиморфизм UGT1A1. Описаны варианты множественные варианты полиморфизма гена UGT 1, частое сочетание rs8175347 полиморфизма UGT1A1 с другими полиморфизмами, как гена UGT1A, так и других генов, большей частью в связи с метаболизмом ксенобиотиков и эндогенных соединений (Геннис Г., 1997; Ильченко Л.Ю., 2006; Рейзис А.Р., 2012; Buyukasik Y., 2008; Strassburg, C. P., 1997). Сведения о распространенности синдрома Жильбера в различных популяциях неоднозначны, от 2% до 36% (Faragó B., 2008), а в России и Сибирском регионе не известны. Недостаточно изучено соотношение гомо- и гетерозигот UGT1A1*28 и их клинико-биохимические особенности (включая характеристики эритроцитов). Четко не определены даже критерии синдрома Жильбера: относить ли к нему лиц с наличием мутации rs8175347 гена UGT 1A1, но без клинических проявлений? Только ли гомозигот? Как относиться к гетерозиготам? Какие сочетания полиморфизмов имеют большее клиническое значение? Все это позволяет говорить о недостаточной клинической проработанности темы.

Цель исследования: Оценить клинико-биохимические параметры, электрические и вязкоупругие (вязкоэластические) характеристики эритроцитов при синдроме Жильбера (с наличием полиморфизма rs8175347 гена UGT1A1).

Задачи:

1. Изучить частоту синдрома Жильбера (с наличием мутации rs8175347 гена UGT1A1) среди лиц с неконъюгированной гипербилирубинемией в исследовании «серия случаев».

2. Оценить клинико-биохимические особенности пациентов с синдромом Жильбера в зависимости от генотипа UGT1A1 (у гомо- и гетерозигот) и наличия сопутствующей патологии печени.

3. Изучить электрические и вязкоэластические свойства эритроцитов при синдроме Жильбера (с наличием полиморфизма rs8175347 гена UGT1A1) в зависимости от генотипа UGT1A1 и наличия сопутствующей патологии печени.

4. Сопоставить клинико-биохимические параметры, вязкоэластические и электрические характеристики эритроцитов в изученных группах.

Научная новизна

Впервые в исследовании «серия случаев» изучена частота мутации rs8175347 гена UGT1A1 у лиц с непрямой (неконъюгированной) гипербилирубинемией и показано, что ее наиболее частой причиной является синдром Жильбера, в том числе, при наличии доцирротической стадии диффузных заболеваний печени (ДЗП) различной этиологии.

Среди лиц с выявленной rs8175347 мутацией UGT1A1 показано преобладание гомозигот (7ТА*7ТА) и большая частота и выраженность клинических и биохимических проявлений синдрома Жильбера (астении, диспепсических расстройств, признаков недифференцированной соединительнотканной дисплазии и гипербилирубинемии).

Впервые при синдроме Жильбера с помощью оригинального метода диэлектрофореза эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле (ДЭФ в НПЭП) изучен комплекс эритроцитарных характеристик и показано, что не только у гомо- (7ТА*7ТА), но и у гетерозигот (6ТА*7ТА) по мутации rs8175347 гена UGT1A1 нарушен целый ряд электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов (в частности, амплитуда деформации, индекс деструкции эритроцитов, электропроводность, емкость мембран, обобщенные показатели жесткости и вязкости), по сравнению со здоровыми лицами без данной мутации.

Впервые выявлены более выраженные изменения параметров эритроцитов при синдроме Жильбера с сопутствующими диффузными заболеваниями печени (низкие амплитуда деформации, поверхностный заряд эритроцитов, емкость мембран, высокие обобщенные показатели вязкости, жесткости, относительная поляризуемость, электропроводность) по сравнению изолированным синдромом Жильбера.

Впервые, в небольшом пилотном исследовании, при синдроме Жильбера изучен ряд характеристик тромбоцитов и показано снижение степени агрегации и средней величины агрегата при использовании средних и малых концентраций АДФ и коллагена, с компенсаторной активацией спонтанной агрегации, что свидетельствует о наличии признаков дизагрегационной тромбоцитопатии.

Предположено, что выявленные изменения в эритроцитах и тромбоцитах, свидетельствующие о системной мембранопатии у пациентов с синдромом Жильбера, не могут быть полностью объяснены нарушением глюкуронизации билирубина и требуют дальнейших исследований, в том числе, поиска ассоциированных с синдромом Жильбера мутаций генов мембранных ферментов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выполненное исследование показывает необходимость включения синдрома Жильбера в дифференциально-диагностический поиск при непрямой гипербилирубинемии, независимо от наличия или отсутствия патологии печени различного генеза. Исследование ТА-полиморфизма гена UGT1A1 является самым верным путем к диагнозу при доступности генетического исследования. Дополнительным, доступным по стоимости и быстрым методом может служить диэлектрофорез эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле, способный выявить наиболее характерные для синдрома Жильбера изменения эритроцитов, в частности, наличие и степень гемолиза.

Одной из важных для практики особенностью является нарушенная резистентность эритроцитов к внешним воздействиям, более выраженная у гомозигот, но присутствующая и у гетерозигот. Это требует осторожного назначения групп медикаментов, в метаболизме которых принимают участие изоферменты UGT1 (не только UGT1A1), в связи с частым сочетанием полиморфизмов и вероятностью получения токсических эффектов или, напротив, не достижения клинического эффекта.

Выявленные отклонения в электрических и вязкоупругих свойствах эритроцитов у пациентов с синдромом Жильбера делают целесообразным проведение исследования у родственников, в том числе при отсутствии ярких клинических проявлений, поскольку вышеописанные нарушения отмечены и у лиц с гетерозиготной мутацией rs8175347 гена UGT1A1.

Выявленное сочетание снижения резистентности эритроцитов у пациентов с синдромом Жильбера с проявлениями дизагрегационной тромбоцитопатии (со снижением степени агрегации на целый ряд индукторов и активацией спонтанной агрегации, что является фактором риска сосудистых нарушений) позволяют предполагать системную мембранопатию и более выраженные сдвиги в системе гемостаза, что требует дополнительного обследования пациентов, в связи с повышенным риском осложнений.

Включение исследования характеристик эритроцитов методом диэлектрофореза в неоднородном переменном электрическом поле у

пациентов с непрямой гипербилирубинемией позволяет ускорить диагностический поиск, оценить вклад эритроцитов в уровень непрямого билирубина, оптимизировать лечение и профилактировать осложнения.

Более выраженные изменения параметров эритроцитов при синдроме Жильбера в сочетании с диффузными заболеваниями печени требуют дополнительных акцентов в терапии, направленных на повышение пластичности клеточных мембран, их заряда, резистентности.

Методология и методы исследования

Для выполнения данной работы использовались общенаучные методы, такие как количественное и качественное описание, измерение, а также общелогические методы - анализ, синтез, статистические методы (описательная и выборочная статистика). Диссертационная работа имеет дизайн «серия случаев».

В исследования включены лица с непрямыми гипербилирубинемиями и условно здоровые (группа сравнения). Все лица подвергались: опросу, анкетированию, методам клинического и лабораторного исследования. Дополнительные исследования для достижения поставленной цели включали изучение ТА-полиморфизма по мутации rs8175347 гена UGT1A1, а также электрических и вязко-эластических свойств эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Среди пациентов с неконъюгированной гипербилирубинемией преобладают лица с синдромом Жильбера (с ТАА-полиморфизмом гена UGT1A1), а среди лиц с данной мутацией преобладают гомозиготы (генотип 7ТА*7ТА). Гомозиготы имеют более яркие клинические и биохимические проявления. У пациентов с синдромом Жильбера в сочетании с диффузными заболеваниями печени уровни эритроцитов и гемоглобина достоверно ниже, а общего билирубина – выше, за счет обеих фракций.

2. Эритроциты при синдроме Жильбера достоверно отличаются от эритроцитов условно здоровых (группа сравнения) более низкими значениями амплитуды деформации, скорости движения к электродам, поляризуемости на всех частотах и более высокими обобщенными показателями вязкости, жесткости, индекса агрегации, относительной поляризуемости и повышенной склонностью к гемолизу клеток на высоких и низких частотах неоднородного переменного электрического поля. Гомозиготное носительство мутации rs8175347 гена UGT1A1 ассоциировано с более выраженными изменениями вязкоэластических и электрических свойств эритроцитов, в частности, с большей склонностью к гемолизу на фоне низких показателей поляризуемости на всех частотах электрического поля.

3. При сочетании синдрома Жильбера с диффузными заболеваниями печени вязкоупругие и электрические свойства эритроцитов нарушены в большей степени, чем при изолированном синдроме Жильбера: в большей степени снижены показатели деформабельности эритроцитов, поляризуемости на всех частотах электрического поля, емкости клеток,

скорости движения эритроцитов к электродам и повышены обобщенные показатели жесткости и вязкости, относительной поляризуемости, электропроводности, а также индекс деструкции эритроцитов. Равновесная частота в большей степени сдвинута в высокочастотный диапазон.

Степень достоверности

Достоверность результатов исследования основана на использовании современных клинического, биохимического и молекулярно-генетических методов исследований в обследованных группах лиц, применении адекватных статистических методов. В исследование включены достаточно большие группы лиц (119 пациентов с непрямой гипербилирубинемией, 20 человек – группа сравнения). Методики обследования, использованные в работе, были стандартизованы для всех участников.

Апробация и внедрение результатов исследования

Материалы диссертации доложены и обсуждены 15 марта 2016 года на объединенном заседании лабораторий НИИ терапии и профилактической медицины. Материалы и основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на: региональной конференции молодых ученых (Красноярск, 2011г.) – первая премия в номинации «Фундаментальные исследования»; IX национальном конгрессе терапевтов (Москва, 2012 г.) – первая премия; Восточно-Сибирской региональной конференции (Красноярск, 2012 г.); Российской гастроэнтерологической неделе (Москва, 2014 г.); Сибирском научном гастроэнтерологическом форуме (Новосибирск, 2014г.); Региональной школе «Вместе преодолеваем сложности в диагностике и лечении заболеваний печени и билиарного тракта» (Новосибирск, 2016 г.).

Материалы и выводы диссертации используются в работе клиниках «НИИТПМ» и ГБУЗ НСО ГKB № 25, а также в учебном процессе – в программах клинической ординатуры и интернатуры НИИ терапии и профилактической медицины и Новосибирского Государственного медицинского университета.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 4 статьи в российских журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 141 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, благодарностей. В диссертации представлены 47 таблиц и 14 рисунков. Список литературы представлен 131 источником (44 отечественных и 87 зарубежных).

Личный вклад

Автором лично выполнены: опрос и осмотр пациентов, включенных в исследование, молекулярно-генетические исследования у части пациентов,

создание базы данных, статистическая обработка материала, анализ и научная интерпретация полученных результатов. В соавторстве написаны и опубликованы все печатные работы в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК, в которых отражены полученные результаты.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Обследовано 119 пациентов с непрямой гипербилирубинемией, нуждающихся в ее дифференциальной диагностике, обратившихся в клинику-диагностическое отделение «НИИТПМ». Дизайн исследования «серия случаев» (рис. 1).

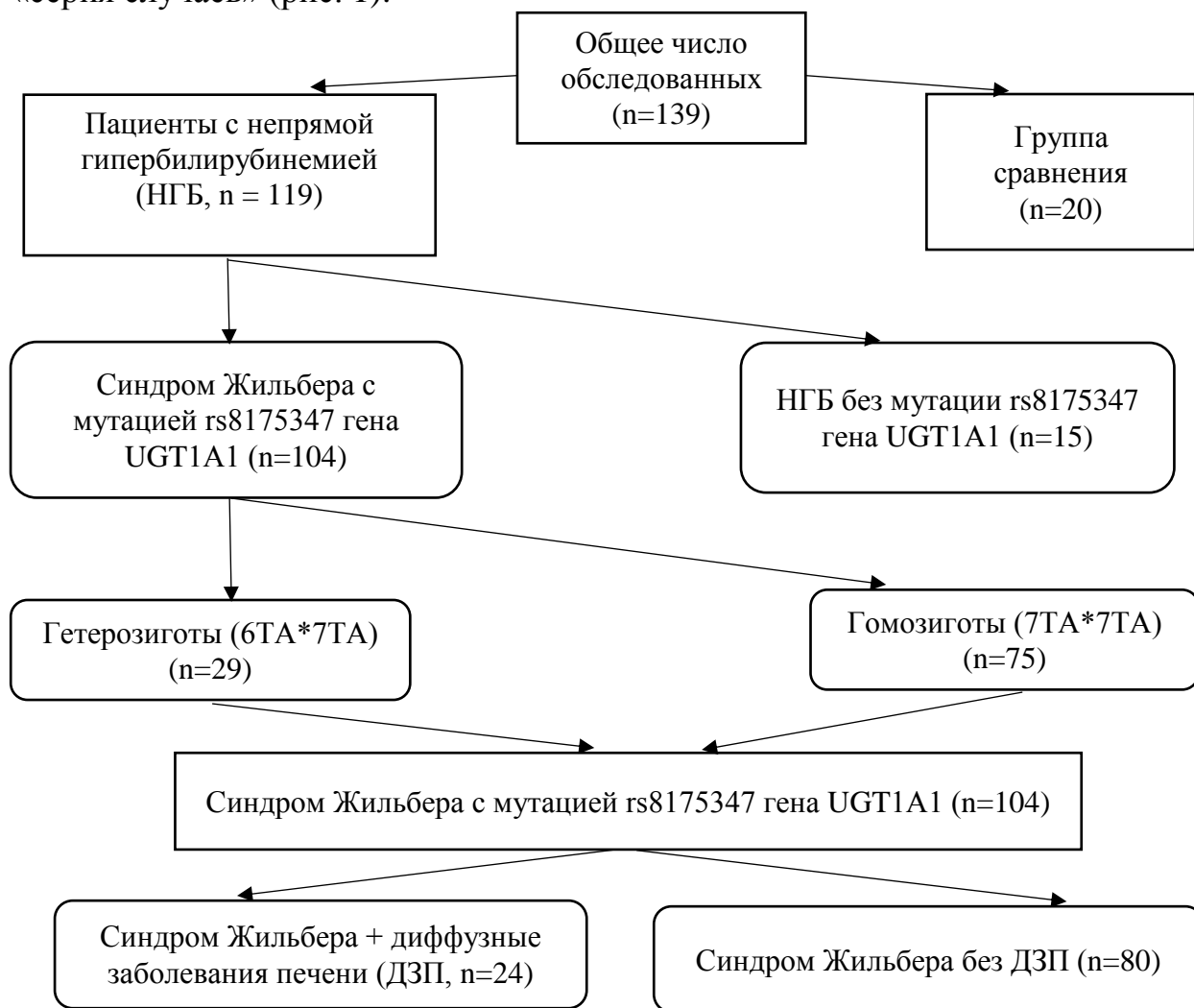


Рис 1. Структура исследования.

В последующем тексте автореферата синдром Жильбера (СЖ) будет упоминаться без добавления расшифровки мутации rs8175347 гена UGT1A, поскольку изучалась только эта мутация.

Средний возраст пациентов с непрямой гипербилирубинемией составил $38,9 \pm 11,29$ лет (не отличаясь от такого при СЖ, в том числе в зависимости от генотипа, $38,3 \pm 11,6$ лет у гетерозигот и $34,02 \pm 10,0$ лет у гомозигот, $p > 0,05$), только в подгруппе с ДЗП возраст оказались большим. Во всех исследуемых подгруппах ~ на 10% преобладали мужчины. В группу сравнения вошли 20 человек (9 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 21 до 68

лет (в среднем $42,2 \pm 3,2$ года).

Среди 104-х пациентов с выявленной мутацией rs8175347 гена UGT1A1, оказалось 75 гомозигот (7ТА*7ТА) и 29 - гетерозигот (6ТА*7ТА) (рис.2).

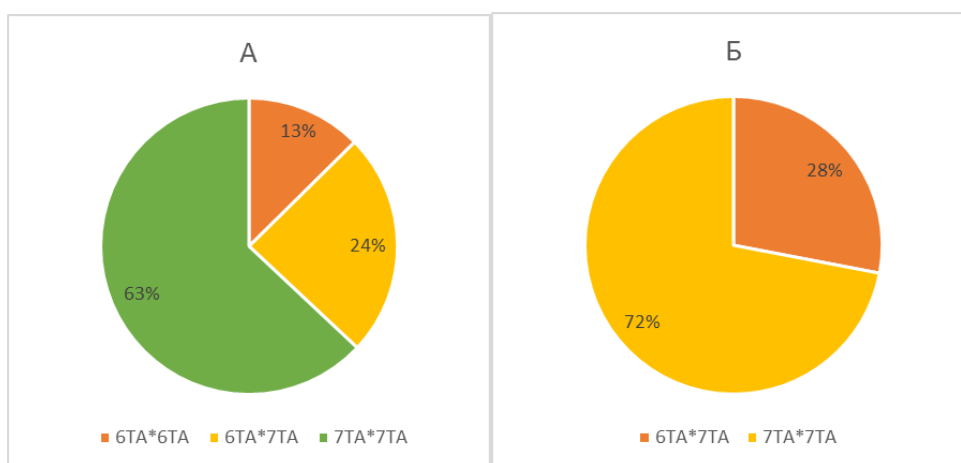


Рис.2. Распределение генотипов UGT1A1 в общей группе пациентов с непрямой гипербилирубинемией (А) и среди пациентов с синдромом Жильбера с мутацией rs8175347 гена UGT1A1 (Б).

У 24 пациентов выявлены признаки патологии печени различного генеза: у 16 - обнаружены маркеры вирусных гепатитов В и С, у двух - неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), у 6 – патология печени смешанного (алкогольного и неалкогольного) генеза. Длительность течения вирусных гепатитов варьировала от 5 до 10 лет, преобладали пациенты с хроническим вирусным гепатитом С, у которых вирусная нагрузка отсутствовала или была минимальной (менее 10^4 копий/мл).

Все группы пациентов обследованы по единой программе. Кроме выяснения жалоб на здоровье, клиническое обследование включало опрос о родословной, частоте и дозах потребляемого алкоголя, предпочитаемых алкогольных напитков. Стандартный осмотр с акцентом на проявления дисплазии соединительной ткани, наличие печеночных знаков, пальпаторную оценку состояния печени и селезенки.

Клинический анализ крови включал определение количества эритроцитов, гемоглобина, средний диаметр эритроцита. Биохимический анализ крови включал определение уровней билирубина и его фракций, общего холестерина (ОХ), триглицеридов, активности АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, ГГТП. Проведен ИФА скрининговых маркеров гепатитов В и С, при положительном результате – определение ДНК HBV и РНК HCV методом ПЦР-диагностики. Учитывали данные ультразвукового исследования органов брюшной полости. Пациентам с диспептическими жалобами верхнюю эндоскопию (ЭФГДС). Дополнительные исследования включали изучение ТА-полиморфизма по мутации rs8175347 гена UGT1A1, а также электрических и вязко-эластических свойств эритроцитов методом диэлектрофореза в неоднородном переменном электрическом поле (ДЭФ в НПЭП). Выбор метода определялся возможностью измерения за короткий период времени множества параметров эритроцитов, хорошей воспроизводимостью, защищенностью

несколькими патентами и свидетельствами (2007-2015 гг.) и успешным использованием при изучении диффузных заболеваний печени различного генеза. Метод и аппаратный комплекс подробно описаны в монографии (Генералов В.М. Кручинина М.В., Дурьманов А.Г. и соавт. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. - Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2011. - 172 с.).

Обследование выполнено с одобрения Комитета Биомедицинской Этики НИИ терапии СО РАМН (протокол №15 от 21.12.2011). Все включенные в исследование подписали информированное согласие на участие.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, ver. 22. Определяли характер распределения количественных признаков методом Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение (M) и стандартная ошибка среднего (m). Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона (при нормальном распределении), в случаях отклонения распределения от нормального использовались непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова, хи-квадрат). Связи между признаками оценивались путем вычисления коэффициента корреляции Спирмена (r). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Клинико-биохимическая характеристика

У пациентов с НГБ (общая группа, n=119) в момент осмотра или в анамнезе желтушность склер или кожных покровов (различной интенсивности) отмечена в 75,6% случаях, с манифестацией в разном возрасте.

Факторы, провоцирующие появление желтухи, выявлены в 67,2% случаев. Самыми частыми оказались стресс и физические нагрузки, реже – употребление лекарств. Существенные различия между генотипами касались возраста манифестации синдрома Жильбера (появления желтухи): у гомозигот это был преимущественно детский и подростковый возраст и крайне редко впервые желтуха отмечена во взрослом состоянии (рис. 3), что описано и другими исследователями (Рейзис А.Р., 2011).

В группе пациентов с выявленной мутацией rs8175347 гена UGT1A1 доминировал астенический синдром (слабость, снижение работоспособности, плохая переносимость физических и психоэмоциональных нагрузок и др.).

При опросе обращало на себя внимание, что около 80% пациентов общей группы либо отрицали потребление алкоголя, либо употребляли его редко и в небольших дозах, объясняя это плохой переносимостью. Возможно при СЖ, имеет место сочетание с полиморфизмом алкоголь-метаболизирующих ферментов. (Шатихин А.И., 1997, Шерлок Ш., 1999).

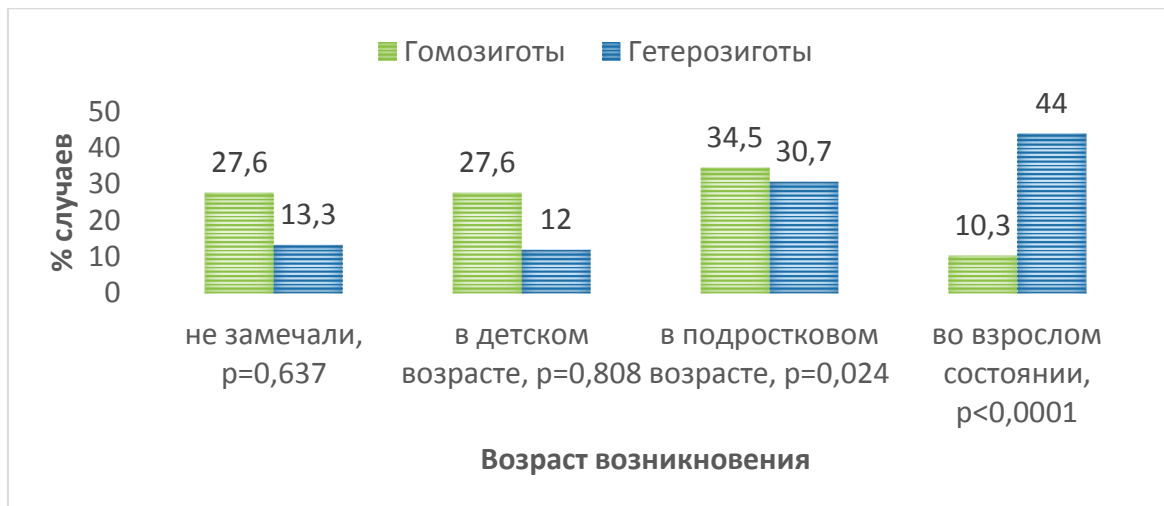


Рис.3. Возраст манифестации желтухи в зависимости от генотипа UGT1A1.

Большая часть пациентов с НГБ (76,5% случаев) имела признаки недифференцированной дисплазии соединительной ткани в различных сочетаниях малых признаков и стигм дисэмбриогенеза, преимущественно за счет синдрома Жильбера с преобладанием у гомозигот (рис. 4). Это, в сочетании с нейротоксическим действием неконъюгированного билирубина на развивающуюся нервную систему в период внутриутробного развития и ранний послеродовой период, может объяснять выраженность астенического синдрома при СЖ (Миуаока Т. , 2011, Рейзис А.Р., 2011).

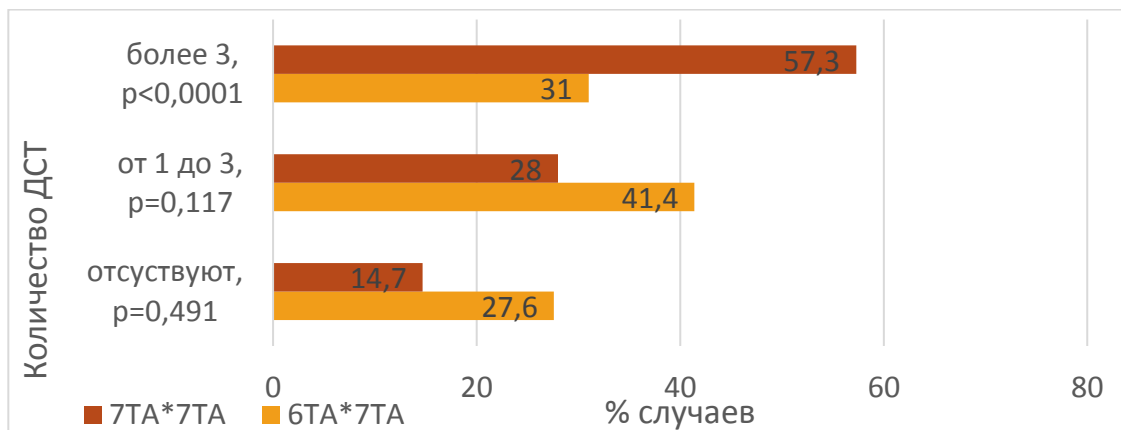


Рис.4. Частота выявления признаков дисплазии соединительной ткани в зависимости от генотипа UGT1A1 (гомозиготы 7TA*7TA, гетерозиготы 6TA*7TA).

Всеобъемлющее распространение в организме соединительной ткани определяет полиорганность поражений при DST, предполагающее вовлечение мембран на разных уровнях (Верещагина Г. Н., 2008; Громова О. А., Торшин И. Ю., 2008; Арсетьев В. Г. И соавт., 2009).

Пальпаторно при СЖ печень была безболезненна, перкуторно размеры (по Курлову) соответствовали нормальным в 82,7% случаев. Только в единичных случаях среди пациентов с СЖ + ДЗП отмечены телеангиоэктазии и увеличение размеров печени более, чем на 1-2 см ниже края реберной дуги. Пальпаторно селезенка не определялась ни в одном случае.

Абдоминальное УЗИ при СЖ выявило высокую частоту изменений билиарного тракта, что согласуется с данными других исследователей (Брагин А. И., 1993, Дубровина Г.М., 2014). Те или иные находки обнаружены в 91,3% случаев. В то же время, значимое увеличение печени и изменения её эхоструктуры были редкими, не противореча известным фактам (Kuntz E., Kuntz H-D., 2002). Значительные различия оказались связанными с генотипом UGT1A1. У гомозигот нормальное состояние желчного пузыря отмечено в 2 раза реже, чем у гетерозигот (16,7% против 35,4%), а желчный сладж и конкременты суммарно обнаружены более чем у 2/3 гомозигот (72%), против 49% у гетерозигот (рис. 5). Подобные изменения указывают на то, что СЖ является фактором риска ЖКБ, тем более, что изменения биохимического состава желчи, характеризующие литогенность желчи, выявляются более чем у 90% пациентов с СЖ (Vulmer A.C., 2008; Tsezou A., 2009). Но вероятно, больший вклад в литогенность желчи вносит не дефект глюкуронизации, а моторно-эвакуаторные расстройства со стороны желчевыводящих путей, связанные с астенической конституцией и ДСТ у большинства пациентов СЖ. К тому же, более чем у трети (37,5%) пациентов с СЖ, у родственников первой линии отмечена периодическая желтушность склер и кожных покровов, и почти у трети (28,8%) - известно о наличии желчнокаменной болезни.

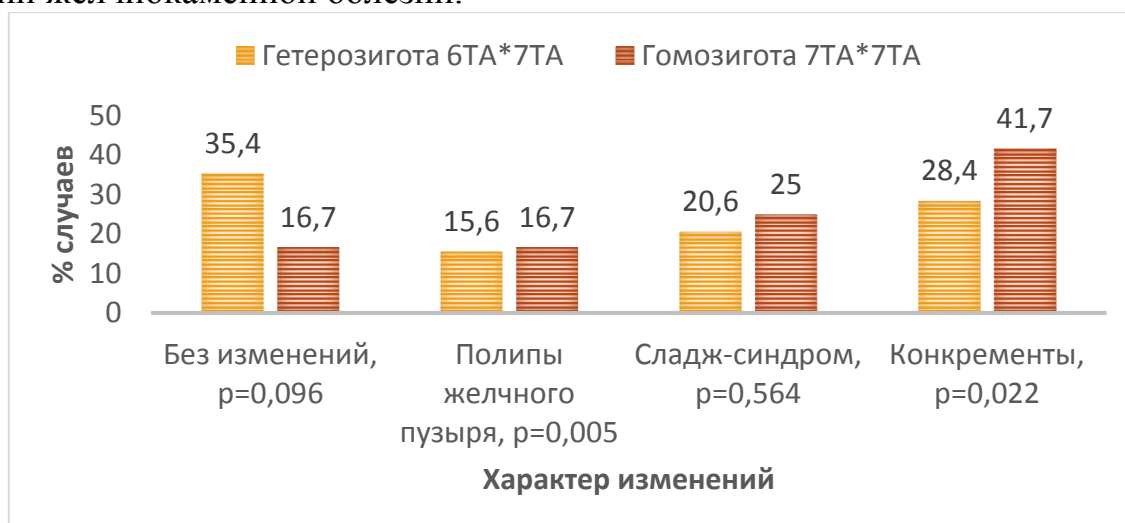


Рис. 5. Частота изменений желчного пузыря в зависимости от генотипа UGT1A1 при ультразвуковом исследовании.

Что касается изменений печени, то в общей группе с СЖ она отмечена в 71,2% случаев, преимущественно за счет подгруппы с ДЗП. Изменения размеров печени при изолированном СЖ (17,5% случаев), связаны с астенической конституцией этих пациентов (при УЗИ больше вертикальный размер, чем у нормостеников).

Что касается биохимических показателей, то естественно, у пациентов с НГБ был повышен по сравнению с контролем уровень как общего ($p < 0,0001$), так и непрямого билирубина ($< 0,0001$). При этом достоверно более высокий уровень непрямого билирубина оказался у гомозигот (табл.1). При сочетании СЖ и ДЗП уровень общего билирубина и его фракций (не

только не прямой, но и конъюгированной фракции) оказался достоверно выше, чем у больных с изолированным синдромом Жильбера (табл.2).

При СЖ в общей группе активность АЛТ, АСТ, ГГТП, ЩФ не отличалась от группы сравнения, но у гетерозигот активность АЛТ оказалась выше контроля (таб. 1). Однако, разброс значений включал цифры, превышающие верхнюю границу нормы, за счет подгруппы с сочетанной патологией (СЖ + ДЗП). Активность АЛТ в этой подгруппе превышало в два раза по сравнению с изолированным СЖ (табл. 2).

По уровню ОХ и ТГ различий между изучаемыми подгруппами не было (табл.1), кроме подгруппы с сочетанной патологией. При СЖ с ДЗП эти показатели были достоверно выше (табл. 2).

Таблица 2.

Биохимические показатели у пациентов с синдромом Жильбера в сочетании с диффузными заболеваниями печени (M±SD).

Параметры	Синдром Жильбера (n=80)	Синдром Жильбера + ДЗП печени (n=24)	P
Общий билирубин, мкмоль/л	40,0±13,23	51,9±12,67	<0,0001
Непрямой билирубин мкмоль/л	32,7±11,7	39,3±9,95	0,010
Прямой билирубин мкмоль/л	7,6±8,74	12,5±6,5	<0,0001
АЛТ, ЕД/л	23,2±12,56	52,9±23,91	<0,0001
АСТ, ЕД/л	24,1±12,82	52,4±19,9	<0,0001
ГГТП, ЕД/л	23,8±11,8	65,1±41,02	<0,0001
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	108,8±60,64	161,8±60,81	<0,0001
Общий холестерин, ммоль/л	4,4±0,92	5,8±1,36	<0,0001
Триглицериды, ммоль/л	1,4±0,72	1,9±0,99	0,002

Примечание: М – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение, р – критический уровень значимости, Ф – фаряды, ДЗП – диффузные заболевания печени, Эр – эритроцит.

Характеристики эритроцитов

При СЖ количество эритроцитов и гемоглобина не зависело от генотипа и не отличалось от контроля (табл. 3), но при сочетании СЖ с ДЗП оба этих показателя оказались достоверно ниже, чем при изолированном СЖ (табл.4). У гомозигот найдены обратная связь эритроцитов с активностью АЛТ и уровнем ТГ, у гетерозигот этих связей не было (табл.5).

Таблица 5.

Корреляции между клиническими и биохимическими показателями крови у пациентов с генотипом 7ТА*7ТА по мутации rs 8175347 гена UGT1A1.

Показатели	Кол. Ег	Нб	АСТ	АЛТ	ГГТП	ТГ	ЩФ	ПБр.	Ср. д-тр Ег
Количество эритроцитов, $10^{12}/л$	н	н	-0,253 (0,029) n=75	-0,213 (0,066) n=75	н	-0,248 (0,032) n=75	н	-0,419 (0,024) n=75	-0,288 (0,012) n=75
Общий билирубин, мкмоль/л	0,236 (0,042) n=75	н	н	н	0,267 (0,021) n=75	н	0,262 (0,023) n=75	н	н
ГГТП, ЕД/л	н	н	0,354 (0,002) n=75	0,294 (0,011) n=75	н	0,299 (0,009) n=75	0,355 (0,003) n=75	н	н

Примечания: в круглых скобках указан показатель достоверности данного коэффициента корреляции, н – корреляция статистически незначима, n – количество пациентов.

Средний диаметр эритроцитов при СЖ (табл. 3) в том числе, при разных генотипах) был достоверно меньше, чем в группе сравнения, но не отличался между группами с изолированным СЖ и СЖ с ДЗП (табл. 4). У гомозигот он был обратно связан с количеством эритроцитов. В небольшой группе (n=15) пациентов с НГБ, без мутации UGT1A1, средний диаметр эритроцитов оказался меньше, чем СЖ, что позволяет предполагать наличие среди них (по крайней мере у части) пациентов с дефектами мембранных ферментов эритроцитов (Kaneko J., Sugawara Y., Maruo Y. et al., 2006).

Наблюдение за характером поведения эритроцитов в НПЭП показали, что эритроциты обследуемых группы сравнения (условно здоровых лиц) на частотах $0,5, 1 \cdot 10^6$ Гц обнаружили ярко выраженную способность к деформации. Они приобретали высокую поступательную скорость в сторону ближайшего электрода и вытягивались в максимальной степени, демонстрируя высокие уровни амплитуды деформации под действием НПЭП (рис. 6А). У большей части обследуемых в частотном диапазоне $0,45-0,5 \cdot 10^6$ Гц отмечена аксиальная ротация эритроцитов, что соответствует положению равновесной частоты. На частотах $0,05, 0,1 \cdot 10^6$ Гц деформации не наблюдалось, эритроциты отталкивались от электродов, единичные клетки под действием электрического поля разрушались.

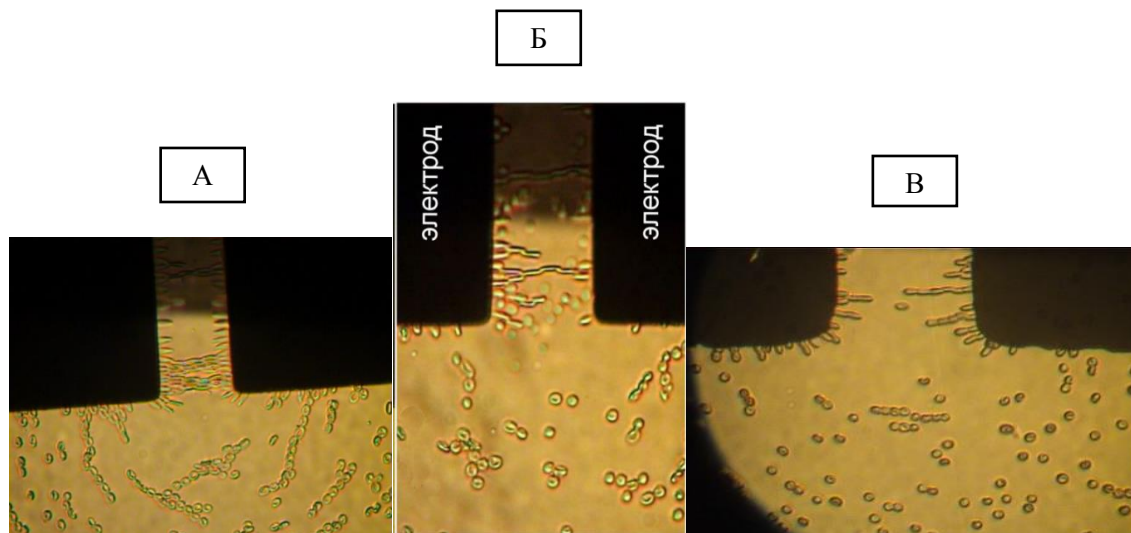


Рисунок 6. Разделение и деформация эритроцитов под действием неоднородного переменного электрического поля на частоте 1 МГц: А – у лиц группы сравнения (высокая степень деформации эритроцитов); Б - значительно повышенный гемолиз эритроцитов у гомозигот по синдрому Жильбера; В – значительно сниженная деформабельность эритроцитов у пациентов с синдромом Жильбера в сочетании с диффузными заболеваниями печени.

Эритроциты пациентов с синдромом Жильбера (общая группа, n=104) отличались от группы условно здоровых достоверно более низкими значениями амплитуды деформации, скорости движения клеток к электродам, поляризуемости на всех частотах и более высокими обобщенными показателями вязкости, жёсткости, индекса агрегации, относительной поляризуемости и повышенной склонностью к гемолизу клеток на всех частотах исследуемого диапазона ($<0,0001$) (табл. 3; табл. 6). Подобные изменения эритроцитов, как биологических субстанций, доставляющих кислород к тканям, ведут к нарушению кислородного баланса тканей различных органов и вероятно вносят вклад в формирование астенического синдрома при СЖ.

Гомозиготное носительство мутации rs8175347 связано с более выраженными изменениями вязко-эластических и электрических свойств эритроцитов, в частности, склонности к гемолизу. Установлены достоверно более низкие уровни поляризуемости, скорости движения к электродам и более высокие показатели относительной поляризуемости и индекса деструкции эритроцитов у гомозигот (рис. 6Б), по сравнению с гетерозиготами на частотах 1МГц и 0,1МГц ($p=0,0001-0,017$). Равновесная частота у гомозигот оказалась сдвинута в более высокочастотный диапазон ($p=0,038$), (рис. 7). Различия в скорости движения клеток к электродам (которая отражает поверхностный заряд клеток), вероятно, обусловлены отличиями в содержании в мембране эритроцитов карбоксильных групп, сиаловых и нейраминовой кислот (связанных с гликопротеинами и гликолипидами мембран), которые в значительной степени определяют плотность поверхностного заряда клеток (Boules R. с соавт.,1988, Izumida Y. с соавт.,1991). Снижение поляризуемости свидетельствует о снижении стойкости эритроцитарной мембраны, и как следствие – сниженной

жизнеспособности эритроцита, что, вероятно, обусловлено генетически детерминированными сдвигами в цитоскелете мембран эритроцитов. Подобное обстоятельство сказывается как на укорочении срока жизни эритроцитов у пациентов с СЖ, так и на их резистентности, что подтверждается рядом исследователей (Watson KJ, Gollan JL., 1989, Schmid R., 1995, Калинин А.В., Хазанов А.И., 2007). Действительно, в подгруппе гомозигот уровень общего и непрямого билирубина прямо коррелировал с индексом деструкции на высоких и низких частотах -10^6 и $5 \cdot 10^4$ Гц ($r = 0,271$, $p = 0,019$ для 10^6 Гц; $r = 0,278$, $p = 0,016$ для $5 \cdot 10^4$ Гц), в то время для прямой фракции эта связь выявилась лишь на высокой частоте $5 \cdot 10^5$ Гц ($r=0,234$, $p=0,043$).

Синдром Жильбера (с мутацией rs8175347 гена UGT 1A1) в сочетании с ДЗП ассоциирован с большим, чем при изолированном СЖ, снижением деформабельности эритроцитов на фоне повышения обобщенных показателей вязкости, жесткости, уменьшением поверхностного заряда, жизнеспособности клеток и нарастанием их склонности к гемолизу на высоких частотах ($5 \cdot 10^5$ Гц) ($p=0,0001-0,049$), (табл. 7). В этой же группе СЖ с ДЗП (СЖ+ДЗП) отмечено достоверное снижение емкости клеток ($p=0,0001$), повышение электропроводности ($p=0,04$) и резкое смещение равновесной частоты в высокочастотный диапазон ($p=0,001$) (табл.4; рис. 7). Резкое смещение равновесной частоты, выраженные сдвиги в электропроводности и емкости клеток, возможно, связаны с токсическим действием более высоких уровней билирубина, который связываясь с эритроцитами, образует комплекс билирубин-альбумин, приводит высвобождению мембранного холестерина и нарушает мембранную асимметрию фосфолипидов (Brito M.A. с соавт., 2002). Подобные изменения могут приводить к гемолизу и эритрофагоцитозу, способствуя таким образом увеличению продукции билирубина и развитию анемии.

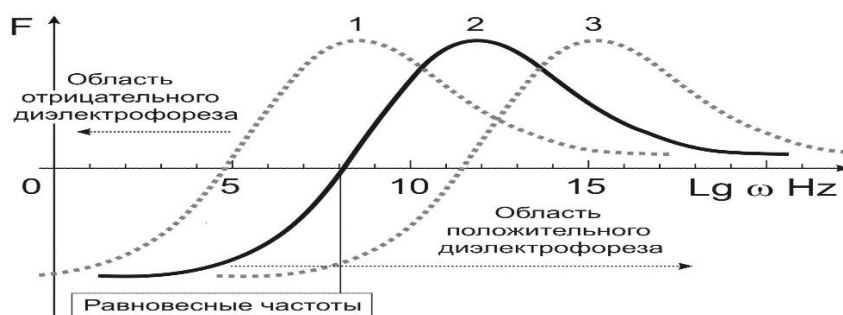


Рис. 7. Положение равновесной частоты (Гц) эритроцитов в НПЭП в:
 1. группе сравнения; 2. в группе гомозигот по синдрому Жильбера;
 3. группе пациентов с синдромом Жильбера в сочетании с ДЗП.

Таблица 1.

Биохимические показатели при синдроме Жильбера (M±SD).

Параметры	Пациенты с СЖ (n=104) I	Гомозиготы, генотип 7ТА*7ТА (n=75) II	Гетерозиготы, генотип 6ТА*7ТА (n=29) III	Группа сравнения (n=20) IV	P			
					P _{I-IV}	P _{II-III}	P _{II-IV}	P _{III-IV}
Общий билирубин, мкмоль/л	42,7±13,97	44,7±14,24	37,7±12,07	13,9±3,20	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,017
Непрямой билирубин мкмоль/л	34,2±11,38	35,4±11,69	30,5±11,14	10,5±2,95	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,041
Прямой билирубин мкмоль/л	8,5±8,50	9,3±9,79	7,2±5,87	3,4±0,54	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,220
АЛТ, ЕД/л	30,1±20,18	28,7±20,26	33,6±19,87	15,8±3,57	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,041
АСТ, ЕД/л	30,6±18,96	29,2±18,55	34,1±19,86	15,8±2,58	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,299
ГГТП, ЕД/л	33,4±28,09	29,2±16,58	44,2±44,82	17,2±3,66	<0,0001	<0,0001	0,016	0,227
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	121,1±64,4	116,2±63,34	133,6±66,61	155,1±23,29	<0,0001	<0,0001	0,032	0,317
Общий холестерин, ммоль/л	4,7±1,2	4,7±1,25	4,7±1,1	4,3±0,54	0,333	0,553	0,204	0,271
Триглицериды, ммоль/л	1,3±0,81	1,5±0,86	1,4±0,67	1,53±0,45	0,137	0,168	0,158	0,601

Примечание: M – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение, p – критический уровень значимости, Ф – фаряды, Эр – эритроцит.

Таблица 3.

Характеристики эритроцитов при синдроме Жильбера (M±SD).

Параметры	Пациенты с СЖ (n=104) I	Гомозиготы, генотип 7ТА*7ТА (n=75) II	Гетерозиготы, генотип 6ТА*7ТА (n=29) III	Группа сравнения (n=20) IV	P			
					P _{I-IV}	P _{II-III}	P _{II-IV}	P _{III-IV}
Количество эритроцитов, /л	4,4±0,72·10 ¹²	4,4±0,73·10 ¹²	4,3±0,69·10 ¹²	4,4±0,45·10 ¹²	0,603	0,260	0,381	0,691
Гемоглобин, г/л	140±16,2	141±17,51	139±12,59	140,9±11,65	0,734	0,704	0,927	0,415
Средний диаметр эритроцита, м	7,4·10 ⁻⁶ ± 1,4·10 ⁻⁷	7,4·10 ⁻⁶ ± 1,33·10 ⁻⁷	7,4·10 ⁻⁶ ± 1,6·10 ⁻⁷	7,5·10 ⁻⁶ ± 0,06·10 ⁻⁷	<0,0001	0,749	<0,0001	<0,0001
Обобщенный показатель жесткости, [Н/м]	(8,88±0,98)·10 ⁻⁶	(8,83±0,79)·10 ⁻⁶	(8,9±1,05)·10 ⁻⁶	(4,89±0,92)·10 ⁻⁶	<0,0001	0,579	<0,0001	<0,0001
Обобщенный показатель вязкости, [Па·с]	0,68±0,068	0,68±0,056	0,68±0,072	0,398±0,093	<0,0001	0,556	<0,0001	<0,0001
Индекс агрегации Эр. [усл.ед.]	0,71 ± 0,063	0,71 ± 0,053	0,71 ± 0,067	0,4 ± 0,065	<0,0001	0,744	<0,0001	<0,0001
Амплитуда деформации, [м]	(0,67±0,092)·10 ⁻⁶	(0,68±0,086)·10 ⁻⁶	(0,67±0,095)·10 ⁻⁶	(1,82±0,42)·10 ⁻⁶	<0,0001	0,758	<0,0001	<0,0001
Скорость движения Эр. к электродам, [мкм/с]	7,14±5,5	7,24±0,066	7,11±6,46	12,75±2,7	<0,0001	0,017	<0,0001	<0,0001
Электропроводность, см/м	6,64±1,54	6,64±1,54	6,63±1,57	3,45±0,87	<0,0001	0,949	<0,0001	<0,0001
Емкость клетки, Ф	7,18±2,49	7,32±7,45	6,81±1,74	7,01±0,38	0,606	0,074	0,277	0,382
Равновесная частота, МГц	0,72±0,72	0,81±0,81	0,47±0,28	0,49±0,028	0,584	0,038	0,715	0,014

Примечание: M – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение, p – критический уровень значимости, Ф – фарады, Эр – эритроцит.

Таблица 6.

Показатели поляризуемости и индекса деструкции на разных частотах НПЭП при синдроме Жильбера (M±SD).

Параметры	Пациенты с СЖ (n=104) I	Гомозиготы, генотип 7ТА*7ТА (n=75) II	Гетерозиготы, генотип 6ТА*7ТА (n=29) III	Группа сравнения (n=20) IV	P			
					P _{I-IV}	P _{II-III}	P _{II-IV}	P _{III-IV}
Поляризуемость, [м ³] (частота 5·10 ⁴ Гц)	$-(3,75 \pm 1,0) \cdot 10^{-15}$	$-(4,21 \pm 0,72) \cdot 10^{-15}$	$-(2,5 \pm 0,52) \cdot 10^{-15}$	$-(1,88 \pm 0,31) \cdot 10^{-15}$	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Поляризуемость, [м ³] (частота 10 ⁵ Гц)	$-(2,31 \pm 0,58) \cdot 10^{-15}$	$-(2,5 \pm 0,44) \cdot 10^{-15}$	$-(1,62 \pm 0,26) \cdot 10^{-15}$	$-(0,91 \pm 0,39) \cdot 10^{-15}$	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Поляризуемость, [м ³] (частота 5·10 ⁵ Гц)	$(3,6 \pm 0,74) \cdot 10^{-15}$	$(3,3 \pm 0,69) \cdot 10^{-15}$	$(4,3 \pm 0,21) \cdot 10^{-15}$	$(8,16 \pm 0,93) \cdot 10^{-15}$	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Поляризуемость, [м ³] (частота 10 ⁶ Гц)	$(4,5 \pm 0,51) \cdot 10^{-15}$	$(4,4 \pm 0,54) \cdot 10^{-15}$	$(4,6 \pm 0,38) \cdot 10^{-15}$	$(11,3 \pm 0,23) \cdot 10^{-15}$	<0,0001	0,024	<0,0001	<0,0001
Относительная поляризуемость	0,53 ± 0,14	0,6 ± 0,094	0,5 ± 0,162	0,084 ± 0,043	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Индекс деструкции E _г на частоте 5·10 ⁴ Гц [%]	1,443± 1,69	1,5± 1,61	1,293± 1,91	0,21± 0,35	<0,0001	0,294	<0,0001	<0,0001
Индекс деструкции E _г на частоте 10 ⁵ Гц [%]	1,521± 1,63	1,8± 1,7	0,738± 1,109	0,12± 0,28	<0,0001	0,002	<0,0001	0,029
Индекс деструкции E _г на частоте 5·10 ⁵ Гц [%]	2,72± 1,95	2,8 ± 1,77	2,34± 1,85	0,035± 0,118	<0,0001	0,252	<0,0001	<0,0001
Индекс деструкции E _г на частоте 10 ⁶ Гц [%]	2,26± 1,95	2,92 ± 1,77	0,572± 1,26	0	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,808

Примечание: M – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение, p – критический уровень значимости, Ф – фарады, Эр – эритроцит.

Таблица 4.

Характеристики эритроцитов у пациентов с синдромом Жильбера в сочетании с диффузными заболеваниями печени (M±SD).

Параметры	Синдром Жильбера (n=80)	Синдром Жильбера + ДЗП печени (n=24)	P
Количество эритроцитов, /л	4,5±0,61·10 ¹²	3,9±0,87·10 ¹²	0,003
Гемоглобин, г/л	142,8±13,9	131,3±20,24	0,001
Средний диаметр эритроцита, м	7,4·10 ⁻⁶ ± 1,4·10 ⁻⁷	7,4·10 ⁻⁶ ± 1,1·10 ⁻⁷	0,185
Обобщенный показатель жесткости, [Н/м]	(8,77±1,04)·10 ⁻⁶	(9,26±0,67)·10 ⁻⁶	0,022
Обобщенный показатель вязкости, [Па·с]	0,67±0,069	0,72±0,046	0,0001
Индекс агрегации Эр. [усл.ед.]	0,71 ± 0,06	0,73 ± 0,073	0,169
Амплитуда деформации, [м]	(0,68±0,095)·10 ⁻⁶	(0,64±0,075)·10 ⁻⁶	0,028
Скорость движения Эр. к электродам, [мкм/с]	7,74±6,13	5,17±1,49	0,0001
Электропроводность, см/м	6,48±1,52	7,16±1,52	0,040
Емкость клетки, Ф	8,01±7,7	4,4±1,76	0,0001
Равновесная частота, МГц	0,59±0,63	1,13±0,84	0,001

Примечание: M – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение, p – критический уровень значимости, Ф – фарады, ДЗП – диффузные заболевания печени, Эр – эритроцит.

Таблица 7.

Показатели поляризуемости и индекса деструкции на разных частотах НПЭП у пациентов с синдромом Жильбера в сочетании с диффузными заболеваниями печени (M±SD).

Параметры	Синдром Жильбера (n=80)	Синдром Жильбера + ДЗП печени (n=24)	P
Поляризуемость, [м ³] (частота 5·10 ⁴ Гц)	-(3,7 ± 1,01)·10 ⁻¹⁵	-(3,9± 0,99)·10 ⁻¹⁵	0,409
Поляризуемость, [м ³] (частота 10 ⁵ Гц)	-(2,2 ± 0,45)·10 ⁻¹⁵	-(2,5 ± 0,67)·10 ⁻¹⁵	0,049
Поляризуемость, [м ³] (частота 5·10 ⁵ Гц)	(3,6± 0,71)·10 ⁻¹⁵	(3,3± 0,81)·10 ⁻¹⁵	0,110
Поляризуемость, [м ³] (частота 10 ⁶ Гц)	(4,55 ± 0,54)·10 ⁻¹⁵	(4,4 ± 0,36)·10 ⁻¹⁵	0,196
Относительная поляризуемость	0,522 ± 0,137	0,59 ± 0,142	0,009
Индекс деструкции Эр на частоте 5·10 ⁴ Гц [%]	1,4±1,68	1,58± 1,75	0,571
Индекс деструкции Эр на частоте 10 ⁵ Гц [%]	1,46± 1,6	1,725± 1,75	0,504
Индекс деструкции Эр на частоте 5·10 ⁵ Гц [%]	2,46± 1,81	3,57± 2,19	0,024
Индекс деструкции Эр на частоте 10 ⁶ Гц [%]	2,56± 2,19	2,176±1,87	0,387

Примечание: M – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение, p – критический уровень значимости, ДЗП – диффузные заболевания печени, Эр – эритроцит

Показатели агрегации тромбоцитов пациентов с синдромом Жильбера с мутацией rs8175347 гена UGT1A1 (пилотное исследование)

Выполненное исследование параметров эритроцитов у пациентов с синдромом Жильбера позволило предположить наличие вероятного мембранного дефекта клеток красной крови, не связанного с дефектом глюкуронизации. Поскольку мембранопатия зачастую носит системный характер, проведено пилотное исследование показателей агрегации тромбоцитов, которые могут дать информацию о сопряженном мембранном дефекте этих клеток крови. В исследование включено 14 пациентов с СЖ и 11 условно здоровых лиц. При СЖ отмечено достоверное снижение степени агрегации тромбоцитов по интенсивности светопропускания по сравнению с группой контроля при использовании средних ($5 \cdot 10^{-6}$ моль) и малых доз АДФ ($0,5 \cdot 10^{-6}$ моль), а также в ответ на использование коллагена ($p < 0,0001 - 0,011$), но активация спонтанной агрегации (табл. 8).

Таблица 8.

Показатели агрегации тромбоцитов при синдроме Жильбера и в группе сравнения ($M \pm SD$).

Тесты	Пациенты с СЖ (n=16)	Группа сравнения (n=11)	p
Степень агрегации тромбоцитов с АДФ 5, %	20,51±16,51	60,37±6,14	<0,0001
Степень агрегации с АДФ 0,5, %	5,72±5,93	12,0±2,06	0,007
Степень агрегации (коллаген), %	33,39±19,18	64,6±4,74	<0,0001
Степень агрегации (спонтанная), %	13,78±17,66	3,74±1,36	0,158
Средняя величина агрегата тромбоцитов, (АДФ 5)	5,62±3,52	8,71±0,74	0,007
Средняя величина агрегата тромбоцитов, (АДФ 0,5)	2,43±2,28	3,54±0,83	0,011
Средняя величина агрегата (коллаген)	10,85±16,8	8,92±1,26	0,001
Средняя величина агрегата (спонтанная)	5,64±4,03	1,24±0,34	0,014

Примечание: M – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение, p – критический уровень значимости, Ф – фарады, Эр – эритроцит.

Учитывая тот факт, что спонтанная агрегация тромбоцитов является фактором риска сосудистых нарушений (в частности, коронарных событий и нарушении мозгового кровообращения) нельзя исключить возможность того,

что снижение экспрессии рецепторов к коллагену и АДФ на мембране тромбоцитов при СЖ может являться компенсаторным механизмом, предотвращающим развитие внутрисосудистых нарушений у данной группы больных (Дроздов А., Дроздова М., 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дифференциальная диагностика непрямых гипербилирубинемий может вызывать сложности у практического врача. Нередки случаи, когда пациентов с наследственными нарушениями обмена билирубина (самым частым из которых является синдром Жильбера) длительно лечат по поводу необоснованно и неправильно диагностированных хронического гепатита или гемолитической желтухи. С другой стороны, синдром Жильбера может быть не распознан на фоне имеющихся диффузных заболеваний печени и гемолитической желтухи, что тоже может привести к неправильным рекомендациям и лечению.

В данном исследовании мы подтвердили преобладание синдрома Жильбера среди неконъюгированных гипербилирубинемий, а среди пациентов с синдромом Жильбера преобладание гомозигот по мутации rs 8175347 гена UGT1A1 и наличие у них более яркой клинической симптоматики, выраженных биохимических отклонений и изменений электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов.

Показана ассоциация синдрома Жильбера с клиническими и биохимическими изменениями, связанными с недифференцированной дисплазией соединительной ткани, что может объяснять выраженную астенизацию.

Показано, что сочетание синдрома Жильбера с диффузными заболеваниями печени различного генеза ведет к более выраженной гипербилирубинемии, но за счет обеих фракций, более выраженным отклонениям в большинстве электрических и вязкоупругих свойств эритроцитов.

Изменения в параметрах тромбоцитов, обнаруженные в пилотном исследовании при синдроме Жильбера, подтверждают гипотезу (высказанную нами при исследовании эритроцитов) о системности мембранных нарушений. Вероятно, у пациентов с СЖ имеются сходные, генетически обусловленные, изменения липидно-белкового компонента мембран не только тромбоцитов, но и эритроцитов.

Данная работа демонстрирует необходимость дальнейших комплексных исследований с включением изучения мембранных ферментов эритроцитов (и других клеток) и кодирующих их генов.

ВЫВОДЫ

1. В исследовании «серия случаев», среди пациентов с неконъюгированной (непрямой) гипербилирубинемией преобладают (84%) лица с синдромом Жильбера (ТА-полиморфизмом UGT1A1), а среди лиц с синдромом Жильбера преобладает генотип 7ТА*7ТА UGT1A1 (72 %).

2. У гомозигот по ТА-полиморфизму UGT1A1 клинические и биохимические проявления синдрома Жильбера выражены ярче и манифестируют преимущественно в детском и подростковом возрасте (в 62,1% случаев), а у гетерозигот в подростковом и у взрослых (в 74,7% случаев). Чаще (у 66,7%) выявляется желчный сладж или конкременты в желчном пузыре. Провоцирующие факторы одинаковы: прием медикаментов, физические и психологические нагрузки.

3. Эритроциты пациентов с синдромом Жильбера, по сравнению со здоровыми людьми с нормальным генотипом UGT1A1, менее устойчивы к внешним воздействиям и жизнеспособны, что подтверждается более низкими значениями диаметра эритроцитов, амплитуды деформации, скорости движения к электродам и поляризуемости на всех частотах и более высокими обобщенными показателями жесткости, вязкости, индекса агрегации и деструкции эритроцитов. У гомозигот (генотип 7ТА*7ТА UGT1A1) показатели относительной поляризуемости и индексы деструкции достоверно выше, чем у гетерозигот (генотип 7ТА*6ТА) UGT1A1, т.е. эритроциты еще менее устойчивы.

4. У пациентов с синдромом Жильбера и диффузной патологией печени различной этиологии (на доцирротической стадии) деформабельность эритроцитов снижена, а обобщенные показатели вязкости, жесткости и индекса деструкции повышены в еще большей степени, т.е. жизнеспособность клеток снижена, а склонность к гемолизу повышена в большей степени, чем просто при синдроме Жильбера.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывая явное преобладание синдрома Жильбера среди неконъюгированных гипербилирубинемий, в том числе при диффузных заболеваниях печени на доцирротической стадии, необходимо обязательное исследование полиморфизма rs8175347 гена UGT1A1.

2. Исследование при непрямых гипербилирубинемиях, в том числе при синдроме Жильбера, электрических и вязкоэластических свойств эритроцитов методом диэлектрофореза в неоднородном переменном электрическом поле позволит выявить склонность к гемолизу и оценить степень риска микроциркуляторных нарушений.

3. Молекулярно-генетический анализа на наличие мутации rs8175347 гена UGT1A1 и исследование электрических, вязкоэластических свойств эритроцитов целесообразно у пациентов с признаками дисплазии соединительной ткани, особенно при ряде клинических ситуаций (беременность, назначение гормонозаместительной терапии, полихимиотерапии и т.д.) в связи с высокой вероятностью осложнений, которые могут быть профилактированы при своевременном выявлении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Курилович С. А., Кручинина С. А., Громов А. А., Немцова Е. Г., Генералов В. М., Бакиров Т. С., Шакиров М. М., Рихтер В. А., Семенов Д. В. Опыт применения новых технологий для изучения комплекса параметров эритроцитов при диффузных заболеваниях печени *Бюллетень Сибирского отделения РАМН. 2011. Т.31.-№6.- С. 21-30.*
2. Кручинина М.В., Генералов В.М., Генералов К.В., Курилович С.А., Воевода М.И., Покровский А.Г., Громов А.А., Баум В.А., Пустыльняк В.О., Чересиз С.В., Сакаева Г.Р., Корбут А.И., Немцова Е.Г., Кранц Е.Ю., Кудина Д.И., Ковалькова Н.А., Зайцев Б.Н. Определение степени фиброза печени методом диэлектрофореза. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. 2013. Т. 11. № 2. С. 66-75.*
3. Кручинина М.В., Курилович С.А., Воевода М.И., Немцова Е.Г., Громов А.А., Генералов В.М., Генералов К.В., Сафатов А.С., Покровский А.Г., Пустыльняк В.О., Чересиз С.В., Сакаева Г.Р. Хронический вирусный гепатит в: взаимосвязь электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов с вирусной активностью. *Архивв внутренней медицины. 2014. № 4 (18). С. 64-71.*
4. Курилович С.А., Немцова Е.Г., Кручинина М.В., Максимов В.Н. Вязкоэластические и электрические параметры эритроцитов при синдроме Жильбера. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015,-№123 (11). С. 28-33.*
5. Kruchinina M.V., Kurilovich S.A., Gromov A.A., Baum V.A., Voevoda M.I., Nemtsova E.G. et al. Possibilities of the optical methods for studying erythrocyte and blood serum in the diagnosing of liver fibrosis degree. *Věda a vznik – 2012/2013 = наука и образование - 2012/2013 materiály ix mezinárodní vědecko-praktická konference, 2012. С. 53-60.*
6. Немцова Е.Г., Кручинина М. В., Курилович С. А., Максимов В. Н., Генералов В.М. Вязкоупругие свойства эритроцитов и полиморфизм гена УДФГТФ при неконъюгированных гипербилирубинемиях. Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири. Мат рег. конференции молодых ученых. Красноярск, 2011; С. 75-76 (Победитель в номинации «Лучший фундаментальный проект»)
7. Курилович С. А., Кручинина М. В., Немцова Е. Г., Максимов В. Н., Генералов В. Клиническая, функциональная гетерогенность синдрома Жильбера. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. Приложение №40, 2012 год, с. 86.*
8. Немцова Е. Г., Курилович С. А., Кручинина М. В., Генералов В.Н. Клиническая, функциональная и генетическая гетерогенность синдрома Жильбера. Материалы VII Национального конгресса терапевтов, М., 2012; (Победитель в номинации «Лучшая работа в области патофизиологии и патогенеза болезней внутренних органов»).
9. Курилович С.А., Немцова Е.Г., Кручинина М.В., Генералов В.М., Коваль

О.Н. Синдром Жильбера и некоторые параметры эритроцитов. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2014. Т. 24. № 5. С. 72.

10. Курилович С. А., Немцова Е. Г., Кручинина М. В., Максимов В. Н. Клинические особенности синдрома Жильбера в зависимости от генотипа UGT1A1. Клиническая и экспериментальная гастроэнтерология. 2016. Т. 25 №10 (в печати).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	-	аденозиндифосфат
АЛТ	-	аланинаминотрансфераза
АСТ	-	аспартатаминотрансфераза
АТФазы	-	аденозинтрифосфатазы
ГГТП	-	гамма-глутамилтрансфераза
ГЭРБ	-	гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь
ДЗП	-	диффузные заболевания печени
ДСТ	-	дисплазия соединительной ткани
ДЭФ	-	диэлектрофороз
ЖКБ	-	жёлчнокаменная болезнь
ИБС	-	ишемическая болезнь сердца
НАЖБП	-	неалкогольная жировая болезнь печени
НГБ	-	непрямая гипербилирубинемия
НПЭП	-	неоднородное переменное электрическое поле
ОХ	-	общий холестерин
ПЦР	-	полимеразная цепная реакция
СЖ	-	синдром Жильбера
ХС	-	холестерин
ЩФ	-	щелочная фосфатаза
ЭФГДС	-	эзофагогастродуоденофиброскопия
G6PD	-	Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа
HVC	-	вирус гепатита С
HBV	-	вирус гепатита В
UGT	-	уридиндифосфатглюкоронилтрансфераза

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность д.м.н. Максиму В. Н. за помощь в выполнении молекулярно-генетических исследований, а также консультацию по генетическим аспектам работы; ст. н. с. Щербаковой Л. В. за помощь в статистической обработке набранного материала.