

ВЗАИМОСВЯЗЬ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ГЕМОХРОМАТОЗА, СИНДРОМА ПЕРЕГРУЗКИ ЖЕЛЕЗОМ И ФИБРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ С

Гомельский государственный медицинский университет

Цель исследования. Анализ взаимосвязи фенотипических проявлений генотипа гемохроматоза с синдромом перегрузки железом и фиброзом при хроническом гепатите С (ХГС).

Материал и методы. Обследовано 39 пациентов с ХГС. Проводилось генотипирование для выявления мутаций в гене *HFE* (ген гемохроматоза), по результатам которого пациенты разделены на 2 группы (1-я группа — пациенты без мутаций, 2-я — с мутациями). В обеих группах оценивали показатели метаболизма железа, рассчитывали индексы фиброза печени.

Результаты. Установлено, что у больных ХГС, имеющих мутации гена *HFE*, статистически значимо чаще развивался синдром перегрузки железом и определялись более высокие показатели индексов фиброза печени. Выявлена также достоверная прямая корреляционная связь показателей обмена железа и значений индексов фиброза печени.

Ключевые слова: хронический гепатит С, гемохроматоз, обмен железа, фиброз печени.

Хронические диффузные заболевания печени (ХДЗП) являются одной из актуальных проблем медицины. Распространенность их весьма широка и мало изучена. Нередко данные заболевания протекают латентно, медленно, незаметно прогрессируя, однако в терминальной стадии заканчиваются тяжелым и малокурабельным патологическим состоянием — циррозом печени. Одной из ведущих причин ХДЗП признают вирусы гепатитов В и С. Замечено, что скорость прогрессирования хронических гепатитов (ХГ) у разных пациентов может существенно различаться, что зависит от многих факторов. В последнее время все большее значение в развитии и прогрессировании ХДЗП придается метаболическим нарушениям, в частности синдрому перегрузки железом (СПЖ). Печень активно депонирует железо, которое в высокой концентрации потенцирует перекисное окисление липидов и фибротические процессы. Одной из причин формирова-

ния СПЖ является мутация гена *HFE*. Известно 5 видов мутаций, детерминирующих возникновение гемохроматоза, но наиболее часто встречаются два варианта, проявляющиеся у взрослых — мутации С282Y и H63D. Эти мутации являются одной из наиболее распространенных генетических поломок, и в большинстве случаев они не приводят к фенотипическим проявлениям, поскольку часто повреждения генома являются гетерозиготными [1]. Тем не менее они могут иметь определенное значение при наличии других факторов, одним из которых может быть вирусная этиология ХДЗП.

Вероятная взаимосвязь между генетическими поломками и ХДЗП исследуется учеными в разных странах. Итальянские ученые, обследовав 143 пациента с хроническим вирусным гепатитом С (ХГС), обнаружили СПЖ примерно в 20% случаев, однако частота мутаций гена *HFE* у них была не выше популяционной, вследствие чего сделан вывод о преимущественной роли патологии печени и нарушений метаболизма в развитии данного синдрома [2].

A. Erhardt и соавт. при обследовании 401 больного ХГС и 295 здоровых лиц не выявили различий встречаемости мутаций гена *HFE* в основной и контрольной группах. Однако данные исследования позволили расценить наличие мутаций как независимый фактор фиброза печени, способствующий прогрессированию процесса и развитию цирроза печени, поэтому учеными был сделан вывод о необходимости типирования гена *HFE* у больных ХГС [3].

Аналогичные данные были получены С. Nezode и соавт., установившими, что встречаемость С282Y и H63D среди больных ХГС не превышает частоту в общей популяции, но при этом у большинства больных наличие мутации сопровождается избыточным отложением железа в печени и значимо более выраженной степенью фиброза [4]. Австралийские ученые проводили оценку влияния мутаций С282Y и H63D на скорость прогрессирования ХГС. Результаты исследования показали, что у пациентов с быстрым прогрессированием фиброза печени частота мутаций гена *HFE* была очень высока и составила 64,2%, а у лиц с медленным прогрессированием болезни — 35,8% [5].

При обследовании 30 больных с ХДЗП с лабораторными признаками СПЖ Л. С. Богуш и соавт. выявили мутантные гены у 36,7% человек данной группы, в том числе у 15 пациентов с ХГС в 2 (13,3%) случаях обнаружена мутация H63D/H63D и в 4 (26,6%) — мутация H63D/N [6].

Золотым стандартом оценки стадии ХГ остается пункционная биопсия печени. Однако в ряде случаев перед практическими врачами встает вопрос о возможностях неинвазивной диагностики фиброза печени, основанной на оценке показателей анализа крови. Данные методы могут быть использованы, например, при обследовании на амбулаторном приеме либо в случае отказа пациента от проведения биопсии.

Цель исследования — установить взаимосвязь фенотипических проявлений генотипа гемохроматоза с СПЖ и фиброзом при ХГС.

Материал и методы

Проведено комплексное клиническое и лабораторное обследование 39 пациентов с ХГС, наблюдавшихся в ГУ РНПЦ РМ и ЭЧ. Вирусная этиология заболевания подтверждалась наличием маркера вирусного гепатита — анти-HCV, а также выявлением РНК HCV в крови пациентов методом полимеразной цепной реакции. Генотипирование пациентов для определения мутаций в гене *HFE* проводили на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Гомельского государственного медицинского университета.

Для оценки метаболизма железа у пациентов определяли содержание сывороточного железа (Fe), ферритина, трансферрина, рассчитывали индекс насыщения трансферрина железом (НТЖ).

Статистическую обработку полученных в результате исследования данных проводили в операционной среде WINDOWS XP с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 7.0 и MEDCALC Software. Описательная статистика включала оценку медианы (Me), минимального (Min) и максимального (Max) значений, 25-го (Q1) и 75-го (Q3) процентилей, 95%-го доверительного интервала (95% ДИ). Сравнение двух независимых выборок по количественному признаку осуществляли методом Манна—Уитни (теста U). При анализе качественного (бинарного) признака использовали метод двустороннего теста точного критерия Фишера. С целью оценки ассоциативной взаимосвязи рассчитывали показатели RR (относительный риск) и OR (отношение шансов). Для определения информативности метода исследования использовали ROC-анализ.

Результаты и обсуждение

По результатам генотипирования пациенты были разделены на 2 группы. 1-ю группу составили 24 (61,5%, 95% ДИ 44,6—76,6) пациента без мутаций в гене *HFE*. Во 2-й группе в 13 (33,3%, 95% ДИ [19,1—50,2]) случаях из 15 были выявлены простые гетерозиготные мутации C282Y/N и H63D/N, одна (2,6%, 95% ДИ [0,1—13,5]) компаундная гетерозигота C282Y/ H63D и одна (2,6%, 95% ДИ [0,1—13,5]) гомозигота по аллелю H63D/ H63D. В целом мутации в гене *HFE* обнаружены у 38,5% пациентов с ХГС. В 1-й группе было 9 мужчин и 15 женщин в возрасте от 17—71 года (Me=43,0; 95% ДИ [37,0—55,0]), во 2-й — 6 мужчин и 9 женщин в возрасте 30—73 лет (Me 51,0; 95% ДИ [42,4—58,8]). Группы не имели статистически значимых различий по возрасту ($P=0,14$) и полу ($P=1,0$).

Таблица 1

Клиническая характеристика обследованных пациентов

Симптом	1-я группа		2-я группа		P
	абс.	%	абс.	%	
Слабость, утомляемость	21	88	13	87	1,0
Бессонница	13	54,2	9	60	0,75
Кожный зуд	7	29,2	5	33,3	1,0
Тошнота	15	62,5	9	60	1,0
Горечь во рту	18	75	10	66,7	0,72
Боль в подреберье	12	50	13	86,7	0,037
Снижение аппетита	7	29,2	7	46,7	0,32
Диарея	13	54,2	8	53,3	1,0
Вздутие живота	18	75	13	86,7	1,0
Похудение	3	12,5	5	33,3	0,22

Клинические данные, полученные при опросе пациентов, представлены в табл. 1. Как видно из представленных данных, из субъективных проявлений заболевания у пациентов обеих групп наиболее часто выявлялся астено-невротический синдром, сопровождавшийся слабостью, повышенной утомляемостью, нарушением сна. На 2-м месте был диспепсический синдром, проявлявшийся чувством горечи во рту, тошнотой, снижением аппетита, диареей и метеоризмом. У части обследованных наблюдалось снижение массы тела. У пациентов с мутациями отмечалась большая распространенность болевого синдрома ($P=0,037$), при этом боли носили, как правило, ноющий, малоинтенсивный характер.

Показатели биохимического анализа крови пациентов представлены в табл. 2.

Анализ данных выявил, что содержание АСТ и ГГТП было несколько выше у пациентов с мутациями гена *HFE* (различия на уровне тенденции). Уровни общего билирубина, холестерина, триглицеридов, общего белка и альбумина не имели существенных различий у пациентов обеих групп. Наиболее значимые различия получены при сравнении показателей, характеризующих метаболизм железа. У паци-

ентов 2-й группы содержание сывороточного Fe, ферритина и НТЖ было статистически значимо выше.

Высокий уровень сывороточного Fe, ферритина, а также НТЖ (более 45%) был выявлен у 7 (46,7%) пациентов с мутациями в гене *HFE*. В группе пациентов без мутаций данные показатели превышали норму только в 2 (9,1%) случаях, различия были статистически значимыми ($P=0,015$).

Для оценки взаимосвязи наличия мутации в гене *HFE* и развития СПЖ рассчитывали показатели RR и OR. RR составил 5,6 (95% ДИ [1,3—23,5], $P=0,018$). Следовательно, наличие мутаций гена *HFE* увеличивает риск развития СПЖ у пациентов с ХГС в 5,6 раза. OR составило 9,6 (95% ДИ [1,6—56,4], $P=0,012$), соответственно шансы выявления мутации гена *HFE* в 9,6 раза выше у пациентов с ХГС при наличии СПЖ.

ROC-анализ диагностической значимости показателей содержания сывороточного железа при определении мутации гена *HFE* показал, что при точке разделения 30,1 (уровень сывороточного Fe, мкмоль/л) чувствительность метода составила 53,3%, специфичность — 95,8%, площадь под кривой — $0,817 \pm 0,07$

Таблица 2

Показатели биохимического анализа крови у обследованных пациентов

Показатель	Группа	Me	Min	Max	Q1	Q3	95% ДИ	P
Fe, мкмоль/л	1-я	19,4	3,5	35,2	11,7	24,5	11,8—22,6	0,001
	2-я	33,5	7,1	49,5	27,4	42,8	24,8—42,8	
НТЖ, %	1-я	27,6	3,6	55,1	15,3	32,9	13,0—40,2	0,011
	2-я	53,0	9,1	89,4	37,3	66,9	24,2—73,6	
Ферритин, мкг/л	1-я	107	18	408	34	188	30—231	0,048
	2-я	538	17	833	78	625	41—705	
АЛТ, ЕД/л	1-я	38	10	183	24	76	24—73	0,371
	2-я	72	19	217	25	104	22—109	
АСТ, ЕД/л	1-я	31	14	108	24	62	25—57	0,055
	2-я	74	20	167	29	102	23—107	
ГГТП, ЕД/л	1-я	29	13	213	18	65	18—59	0,053
	2-я	54	19	655	34	88	33—100	
ЩФ, ЕД/л	1-я	78	52	180	62	91	62—85	0,193
	2-я	92	57	173	62	117	61—124	
Общий билирубин, мкмоль/л	1-я	17,4	7,1	40,5	10,9	24,7	12,1—20,4	0,874
	2-я	17,6	9,0	79,5	11,4	20,7	10,8—27,9	
Альбумин, г/л	1-я	43,5	34,0	49,0	41,0	46,5	41,0—46,6	0,855
	2-я	42,0	37,0	52,0	40,3	47,8	39,6—48,0	
Общий белок, г/л	1-я	73	63	87	69	80	70—79	0,554
	2-я	76	52	87	71	80	71—81	
Холестерин, ммоль/л	1-я	4,6	2,6	7,7	3,7	5,4	3,7—5,2	0,731
	2-я	4,3	3,0	7,0	3,6	6,0	3,4—6,0	
Триглицериды, ммоль/л	1-я	0,95	0,22	1,64	0,61	1,13	0,40—1,42	0,243
	2-я	1,05	0,34	2,81	0,87	1,54	0,81—2,77	

($P=0,0001$), отношение правдоподобия положительного результата составило 12,6. Таким образом, повышенный уровень сывороточного Fe у пациентов с ХГС указывает на высокую вероятность наличия мутаций гена *HFE*.

В целом полученные данные позволяют говорить о том, что мутации гена *HFE* оказывают существенное влияние на формирование СПЖ у пациентов с ХГС. Наличие СПЖ является основанием для проведения генотипирования пациентов.

Далее всем пациентам проводили неинвазивную оценку фиброза печени с помощью тестов APRI, FIB-4 и Forns.

В тесте APRI используется два показателя — уровень АСТ и количество тромбоцитов. Формула расчета: $APRI = \text{АСТ} \cdot 100 / (\text{верхний предел АСТ}) \cdot \text{тромбоциты} (10^9/\text{л})$. Оценка теста: вероятность значительного фиброза велика, если полученное значение больше 1,0 и мала — если меньше 0,5 [7].

Индекс FIB-4 разработан американскими учеными из Вирджинского университета на основе обследования 832 пациентов с коинфекцией вируса иммунодефицита человека и гепатита С. Формула расчета: $FIB-4 = \text{возраст (лет)} \cdot \text{АСТ} / (\text{тромбоциты} (10^9/\text{л}) \cdot \sqrt{\text{АЛТ}})$. Оценка теста: вероятность значительного фиброза печени мала (порядка 90%) при значении менее 1,45 и велика — при более 3,25 [8].

Тест Forns разработан X. Xavier Forns и соавт. на основе обследования 476 пациентов с ХГС, которым проводилась биопсия печени. Формула расчета: $Forns = 7,811 - 3,131 \cdot \ln(\text{тромбоциты}) + 0,781 \cdot \ln(\text{ГГТП}) + 3,467 \cdot \ln(\text{возраст}) - 0,014 \cdot (\text{холестерин, мг/дл})$. Оценка теста: значение менее 4,2 соответствует отсутствию фиброза больше I степени с вероятностью 96% [9].

Для установления возможности использования данных индексов в целях неинвазивной оценки фиброза печени у всех пациентов про-

ведено определение степени корреляции индексов между собой по методу Спирмена.

Обнаружена достоверная прямая корреляционная связь между индексом FIB-4 и индексами APRI ($R=0,850$; $P<0,001$) и Forns ($R=0,843$; $P<0,001$). Между индексами APRI и Forns также выявлена прямая корреляционная связь ($R=0,746$; $P<0,001$). Полученные данные могут свидетельствовать о достаточно высокой достоверности этих показателей при оценке степени фиброза печени, что позволяет использовать их как альтернативу пункционной биопсии печени.

Результаты сравнительной оценки показателей индексов фиброза печени у обследованных пациентов представлены в табл. 3.

Как видно из представленных данных, у пациентов 2-й группы отмечали статистически значимо более высокие показатели всех индексов фиброза печени по сравнению с пациентами без мутаций гена *HFE*.

Проанализирована также частота выявляемости диагностически значимых (высокая и низкая вероятность значительного фиброза печени) величин индексов фиброза печени в группах пациентов без мутаций гена *HFE* и с наличием таковых (рис. 1—3).

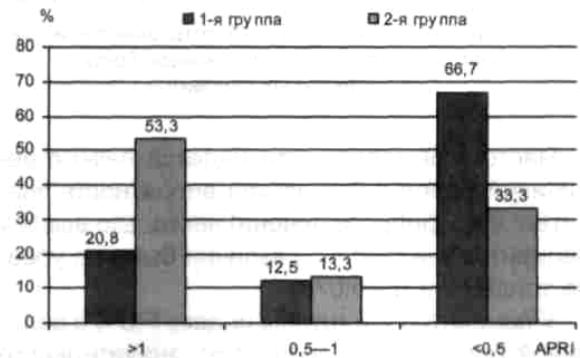


Рис. 1. Сравнительная оценка частоты выявляемости диагностических величин индекса APRI у обследованных пациентов

Сравнительная оценка индексов фиброза печени у пациентов без мутаций и с мутациями гена гемохроматоза

Таблица 3

Индекс	Группа	Me	Min	Max	Q1	Q3	95% ДИ	P
APRI	1-я	0,34	0,16	1,74	0,29	0,67	0,29—0,57	0,035
	2-я	1,12	0,19	4,59	0,33	1,98	0,28—2,12	
FIB-4	1-я	0,99	0,38	3,27	0,81	1,71	0,81—1,59	0,005
	2-я	2,76	0,55	8,19	1,29	4,62	1,20—4,79	
Forns	1-я	3,77	1,49	8,03	3,17	5,93	3,23—5,86	0,035
	2-я	6,39	2,21	10,94	4,35	7,27	4,06—7,87	

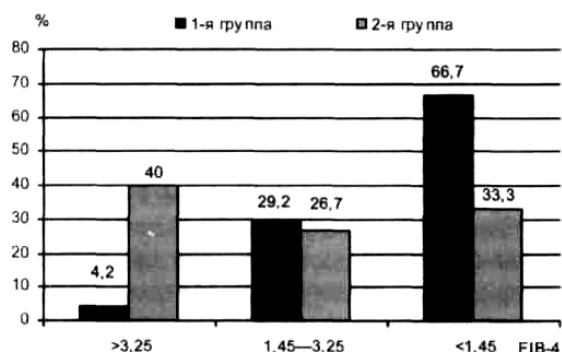


Рис. 2. Частота выявляемости диагностических величин индекса FIB-4 у обследованных пациентов

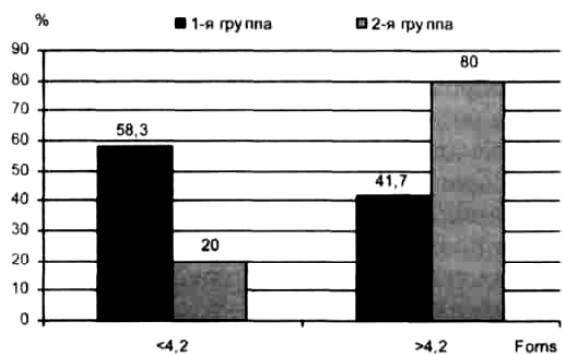


Рис. 3. Сравнительная оценка частоты выявляемости диагностических величин индекса Forns у обследованных пациентов

Частота выявляемости индекса APRI с величиной более 1,0 (высокая вероятность значительного фиброза печени) несколько выше у пациентов 2-й группы, различия были на уровне тенденции ($P=0,078$).

У пациентов 2-й группы индекс FIB-4 с величиной более 3,25 (вероятность значительного фиброза печени порядка 90%) встречался значительно чаще, чем у обследованных 1-й группы ($P=0,008$).

Частота встречаемости индекса Forns с величиной менее 4,2 (вероятность отсутствия фиброза больше I степени составила 96%) у пациентов 2-й группы была почти в 3 раза ниже, чем в 1-й группе ($P=0,024$).

Высокую вероятность значительного фиброза можно предполагать при сочетании у одного пациента индексов APRI более 1,0 и FIB-4 более 3,25. Такое сочетание было обнаружено у 6 (40%) обследованных с мутациями гена *HFE* и только у 1 (4,2%) — без мутаций ($P=0,008$). RR соста-

вил 9,6 (95% ДИ [1,28—72,1], $P=0,028$), то есть, согласно полученным данным, наличие мутации гена *HFE* увеличивает риск значительного фиброза у пациентов с ХГС почти в 10 раз.

О существенной роли СПЖ в прогрессировании патологии печени у пациентов с ХГС свидетельствуют данные, полученные при проведении корреляционного анализа показателей метаболизма железа и индексов фиброза печени, показавших наличие прямой связи изучаемых параметров (табл. 4).

Таблица 4

Корреляционная связь показателей метаболизма железа и индексов фиброза печени

Показатель	APRI	FIB-4	Forns
Fe	0,527 ($P=0,001$)	0,574 ($P<0,001$)	0,501 ($P=0,002$)
Ферритин	0,627 ($P=0,002$)	0,678 ($P=0,001$)	0,705 ($P<0,001$)
НТЖ	0,484 ($P=0,013$)	0,627 ($P=0,001$)	0,554 ($P=0,004$)

Выводы

1. Мутации гена *HFE* выявлены у 38,5% пациентов с ХГС (33,3% — С282Y/N и H63D/N, 2,6% — компаундная гетерозигота С282Y/H63D и 2,6% — гомозигота H63D/H63D).

2. У пациентов с ХГС с мутациями гена *HFE* выявлена более высокая частота СПЖ ($P=0,015$), а также отмечены статистически значимо более высокие показатели сывороточного Fe, ферритина и НТЖ.

3. Наличие мутаций гена *HFE* у пациентов с ХГС увеличивает у них риск развития СПЖ в 5,6 раза.

4. При наличии СПЖ шансы выявления мутации гена *HFE* возрастают в 9,6 раза.

5. Наличие мутации гена *HFE* у больных ХГС проявляется более высокими по сравнению с пациентами без мутаций показателями индексов фиброза печени и относительным риском формирования значительного фиброза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Press R. D. // Arch. Pathol. Lab. Med.— 1999.— Vol. 123, № 11.— P. 1053—1059.
2. Valenti L., Pulixi E. A., Arosio P., et al. // Haematologica.— 2007.— Vol. 92.— P. 1037—1042.
3. Erhardt A., Maschner-Olberg A., Mellenthin C., et al. // J. Hepatol.— 2002.— Vol. 38.— P. 335—342.
4. Hezode C., Cazeneuve C., Coue O., et al. // J. Hepatol.— 1999.— Vol. 31.— P. 979—984.

5. Richardson M. M., Powell E. E., Barrie H. D., et al. // *J. Med. Genet.*— 2005.— Vol. 42.— P. 45—49.
6. Бозуш Л. С., Сивицкая Л. Н., Даниленко Н. Г. // *Мед. панорама.*— 2009.— № 7 — С. 52—55.
7. Wai C. T., Greenson J. K., Fontana R. J., et al. // *Hepatology.*— 2003.— Vol. 38.— P. 518—526.
8. Sterling R. K., Lissen E., Clumeck N., et al. // *Hepatology.*— 2006.— Vol. 43.— P. 1317—1325.
9. Xavier Forns X., Ampurdanes S., Llovet V., et al. // *Hepatology.*— 2002.— Vol. 36.— P. 996—989.

Поступила 16.05.13.

RELATIONSHIP OF MUTATIONS IN HEMOCHROMATOSIS GENE, IRON OVERLOAD SYNDROME AND FIBROSIS AT CHRONIC HEPATITIS C

I. V. Paltsev, A. L. Kalinin

Objective. Analysis of phenotypical displays of hemochromatosis genotype interrelations with iron overload syndrome and fibrosis at chronic hepatitis C (CHC) was the aim of the study.

Materials and methods. 39 patients with CHC were examined. Mutations in gene HFE (hemochromatosis gene) were revealed in every patient, the patients were divided into two groups in accordance with the findings (group 1 — patients without mutations, group 2 — patients having mutations). In both groups the indicators of iron metabolism were estimated, the indexes of liver fibrosis were calculated.

Results. It has been revealed that the patients suffering from CHC and having mutations of hemochromatosis gene demonstrated the iron overload syndrome and had higher indicators of indexes of liver fibrosis reliably more often. A reliable direct correlation between the iron metabolism indicators and the indexes of liver fibrosis was revealed.

Key words: chronic hepatitis C, hemochromatosis, iron metabolism, liver fibrosis.

Адрес для корреспонденции:

Пальцев Игорь Владимирович.

Гомельский государственный медицинский университет.
246000, г. Гомель, ул. Ланге, 5; сп. тел. (8-0232) 37-72-93.