

кулярно-генетические методы исследований, базирующиеся на анализе высокополиморфных участков ДНК — коротких таандемных повторов (short tandem repeats, STR). Однако данный подход, несмотря на высокую информативность, обладает ограниченной чувствительностью. В этой связи представляется целесообразным внедрение более чувствительных диагностических решений, в частности, анализа InDel-полиморфизма, с последующим выявлением продуктов ПЦР в режиме реального времени. При анализе ряда маркеров были получены данные, свидетельствующие о более высокой чувствительности данного метода, однако наличие отклонений в оценке соотношений клеток в интервале от 10 до 90 % указывает на целесообразность использования данного подхода лишь при оценке остаточной популяции клеток реципиента.

Ключевые слова: химеризм, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, микросателлитные повторы, InDel полиморфизмы, STR-локусы.

SUMMARY

I. M. Barkhatov, A. I. Shakirova, A. V. Evdokimov, D. E. Ershov, O. G. Smykova, L. S. Zubarovskaya, B. V. Afanasyev

InDel-polymorphisms in quantitative posttransplant chimerism evaluation

Reduction of minimal residual disease to undetectable levels is the key criterion for efficiency of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT), along with engraftment of transplanted cells with complete replacement of recipient hematopoiesis, i. e., full post-transplant chimerism. Among different approaches, molecular genetic techniques are preferable, being based on the analysis of highly polymorphic DNA sequences (short tandem repeats, STRs). However, this approach, despite its high specificity, has a limited sensitivity. In this regard, it seems appropriate to introduce more sensitive diagnostic solutions, in particular, analysis of insertion/deletion (InDel) polymorphisms, followed by real-time detection of PCR products. The data obtained upon analysis of several genetic markers have shown higher sensitivity of this method. However, the deviations in the range of 10 to 90 % in evaluation of the cell ratios indicates the feasibility of using this approach just to evaluate the residual populations of recipient cells.

Keywords: chimerism, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, INDEL polymorphisms, STR markers.

© Н. С. Жевнерова, Т. В. Антонова, В. А. Ковалева, 2016 г.
УДК 616.36-002.1-074

**Н. С. Жевнерова, Т. В. Антонова,
В. А. Ковалева**

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С НА РАННИХ СРОКАХ РАЗВИТИЯ

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова

ВВЕДЕНИЕ

Лидером среди хронических вирусных заболеваний печени является хронический гепатит С (ХГС), который остается неуправляемой инфекцией. Анализ современной эпидемиологической ситуации позволяет считать, что в России проживает не менее 3 млн больных ХГС, а маркеры инфекции HCV имеются у 4 млн человек [6].

В практике редко удается выявить острый гепатит С, который в подавляющем большинстве случаев протекает субклинически или в стертой форме и, почти закономерно, становится фазой развития хронической инфекции. Преимущественно впервые заболевание выявляется уже в стадии хронического гепатита, особенностью которого также служит длительное скрытое течение. Это объясняет отсутствие повода для обращения за медицинской помощью, что нередко приводит

к поздней диагностике и, при полноценном обследовании, выявлению ХГС уже на далеко зашедших стадиях заболевания, в частности цирротической. В то же время не исключается возможность длительного торпидного течения гепатита с минимальными темпами прогрессирования фиброза печени.

Одной из важных проблем клинической практики является определение индивидуального прогноза течения ХГС, который во многом зависит от объективной оценки выраженности и темпов развития фиброза печени. Наличие фиброза печени успешно оценивается по результатам биопсии или с помощью неинвазивных методов.

В настоящее время известны многие маркеры, используемые в так называемых комплексных фиброзных панелях для неинвазивной диагностики фиброза: гиалуроновая кислота, коллагены-4 и -6, матриксные металлопротеиназы и тканевой ингибитор металлопротеиназы-1, альфа-2-макроглобулин, гаптоглобин и др. [1, 3]. Тем не менее, продолжается поиск других сывороточных маркеров, отражающих не только наличие, но и процесс развития фиброза печени. Гликопротеин галектин-3 признан медиатором воспаления и фиброза, роста и пролиферации фибробластов различных тканей [5]. Соответственно, этот показатель может рассматриваться как индикатор активности хронического воспаления с нарушением функции гепатоцитов и, как следствие, разрастания нефункциональной соединительной ткани в печени [8, 9], что согласуется с информацией о его роли в про-

Таблица 1
Частота выявления жалоб пациентов
в зависимости от продолжительности ХГС

Продолжительность заболевания, лет	Клинические проявления (число пациентов, %)		Всего
	есть	нет	
Меньше 3	9 (43 %)	12	21
Больше 8	18 (67 %)	9	27

грессии фиброза различных органов, в том числе печени [2, 4].

Одним из подходов к объективной оценке активности патологического процесса при ХГС может быть исследование потенциальных индикаторов фиброза, в частности, галектина-3, в сопоставлении со стандартными биохимическими и вирусологическими характеристиками инфекции.

Целью исследования явилась оценка клинико-лабораторных показателей у больных ХГС на ранних сроках развития и их сопоставление с уровнем галектина-3.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 78 больных ХГС с малосимптомным течением заболевания в возрасте от 20 до 55 лет. В большинстве случаев (90 %) гепатит С был выявлен впервые при профилактическом обследовании. Диагноз ХГС установлен на основании клинико-эпидемиологических данных, результатов лабораторного и инструментального обследования, при обнаружении в крови маркеров вируса: антител к HCV (методом ИФА) и HCV-RNA (методом ПЦР). Методом ПЦР определен генотип вируса и вирусная нагрузка. Стадию фиброза печени определяли методом непрямого ультразвуковой эластографии печени (на аппарате Fibroscan).

Таблица 2
Частота изменения биохимических маркеров активности
ХГС при разной продолжительности заболевания, %

Показатель		До 3 лет	Более 8 лет
		Активность АлАТ, Ед/л	До 40
	41–80	23,8	33,3
	81–120	14,3	18,5
	Более 120	19,0	22,2
γ-глобулины	Норма	66,7	56,5
	Выше нормы	33,3	43,5
Тимоловая проба	Норма	64,7	66,7
	Выше нормы	35,3	33,3

Таблица 3
Вирусная активность при разной продолжительности ХГС

Вирусная нагрузка HCV, МЕ/мл	Частота изменения показателя при разной продолжительности заболевания, %	
	до 3 лет	более 8 лет
Менее 500 000	57,1	30,0
500 000–1 000 000	4,8	10,0
Более 1 000 000	38,1	60,0

Из исследования исключены больные с признаками субкомпенсированного и декомпенсированного цирроза печени (по Child-Pugh, 1973), имеющие хронические заболевания печени другой этиологии, тяжелую сопутствующую соматическую патологию. Исключены пациенты с токсическими поражениями печени (гепатотоксичные препараты, потребление наркотических средств, хронический алкоголизм).

Стандартное лабораторное обследование включало определение в крови активности АлАТ, уровня общего билирубина, тимоловой пробы, уровня гамма-глобулинов.

Содержание галектина-3 в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием набора реактивов «DRG Insulin ELISA (EIA – 2935)» (DRG Diagnostics, США).

Полученные данные обрабатывали в статистической программе «SPSS for Windows».

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У 69 больных выяснен путь инфицирования гепатитом С. Преобладающее большинство больных (96 %) имели парентеральный путь заражения гепатитом, из них 65 % указывали на медицинские манипуляции. Употребление наркотиков в анамнезе было у 14 % больных.

У 76 пациентов при уточнении значимых эпидемиологических данных удалось определить сроки инфицирования. У 21 больного продолжительность заболевания была менее 3 лет; у 28 пациентов – от 3 до 8 лет; у 27 пациентов – более 8 лет.

В дальнейшее исследование включены две группы пациентов: с ранними сроками развития заболевания (продолжительность менее 3 лет) и группа сравнения – пациенты с продолжительностью заболевания более 8 лет.

При детальном выяснении анамнеза у 32 – 35 % пациентов были выявлены незначительные жалобы, соответственно, диспептического и астеновегетативного характера.

У каждого третьего из числа обследованных при осмотре обнаружено незначительное увеличение размеров печени с диффузными изменениями структуры печени (по результатам УЗИ). По мере увеличения продолжительности заболевания незначительно увеличивалось число больных, имеющих те или иные клинические проявления хронического гепатита (табл. 1).

При лабораторном обследовании у большинства пациентов (83 %) уровень общего билирубина в сыворотке крови был в пределах нормы и в среднем составил 9,0 мкмоль/л (7,0; 13,5). У 17 % обследованных отмечено незначительное его по-

вышение (не более чем в 1,5 раза по сравнению с нормой), что в среднем составило 23,5 мкмоль/л (19,3; 28,6).

Один из ключевых биохимических показателей активности гепатита – активность АлАТ в крови – в среднем составил 52,0 Ед/л (29,0; 122,0). При этом существенно чаще отсутствие повышения этого показателя, отражающего цитолиз, обнаружено на ранних сроках заболевания (у 43 % пациентов) в сравнении с данными у лиц с продолжительностью ХГС более 8 лет (26 %). Это подтверждает положительная корреляционная связь слабой силы между уровнем АлАТ и продолжительностью заболевания ($r = 0,220$, $p = 0,056$).

В случаях с биохимическими признаками цитолиза степень повышения активности АлАТ практически не имела различий в сравниваемых группах (табл. 2). Тимоловая проба и доля гамма-глобулиновой фракции белков у большинства пациентов оставались в пределах нормы. При повышении этих показателей не обнаружено различий в их реагировании от продолжительности гепатита.

Важной характеристикой текущей инфекции служит концентрация вируса в крови. Несмотря на то, что у большинства обследованных больных ХГС характеризовался стертой клинической симптоматикой и минимальной биохимической активностью, у половины из них (49 %) вирусная нагрузка составила больше 1 000 000 МЕ/мл. У 57 % больных ХГС с небольшой продолжительностью заболевания (до 3 лет) вирусная нагрузка была невысокой – менее 500 000 МЕ/мл. Отмечено, что по мере увеличения продолжительности хронического гепатита чаще определяется более высокая вирусная нагрузка: у 60 % больных со сроками заболевания более 8 лет вирусная нагрузка была более 1 000 000 МЕ/мл (табл. 3).

Наибольший интерес представляют сведения о разной степени выраженности фиброза печени (стадии заболевания) у пациентов на ранних сроках развития заболевания, что позволяет судить о возможных темпах прогрессирования фиброза. У 80 % пациентов с ХГС продолжительностью менее 3 лет выявлено отсутствие или минимальная его выраженность. Вместе с тем аналогичные стадии фиброза $F_0 - F_1$ обнаружены и у 61,5 % пациентов со стажем заболевания более 8 лет. В этой группе пациентов обнаружена тенденция к более частому выявлению умеренного и тяжелого фиброза и цирроза печени (табл. 4).

Однако, как видно из данных табл. 4, уже на ранних сроках заболевания были обнаружены изменения печени, соответствующие тяжелому фиброзу печени и циррозу F_3 и F_4 (у 10 % пациентов). Эти дан-

Таблица 4
Стадии фиброза печени при разной продолжительности ХГС

Стадия фиброза печени	Частота изменения показателя при разной продолжительности заболевания, %	
	до 3 лет	более 8 лет
$F_0 - F_1$	80,0	61,5
F_2	10,0	19,2
F_3	5,0	7,7
F_4	5,0	11,6

ные подтверждают существенно различающиеся темпы формирования фиброза печени по мере развития ХГС при естественном течении. В связи с этим мы провели сопоставление ключевых показателей, характеризующих ХГС, – активности АлАТ и вирусной нагрузки – со стадией фиброза печени (табл. 5).

Как видно из данных табл. 5, у большинства больных активность АлАТ была в пределах 2 норм независимо от степени фиброза печени: на фоне фиброза печени $F_0 - F_1$ – у 70,6 % больных, при фиброзе $F_2 - F_4$ – у 60 % больных. При сопоставлении активности АлАТ с концентрацией вируса в крови (табл. 5) выявлена тенденция к большей активности фермента при высокой вирусной нагрузке. Найдена положительная корреляция умеренной силы между активностью АлАТ и вирусной нагрузкой ($r = 0,360$, $p = 0,004$).

Таким образом, в исследуемой группе пациентов с ХГС общепринятые биохимические маркеры активности гепатита и вирусологические показатели достоверно не отражали формирование и прогрессирование фиброза печени и не зависели от продолжительности заболевания.

Исследование уровня галектина-3 у пациентов с ХГС позволило установить повышение этого показателя у большинства обследованных: средний уровень галектина-3 составил 3,64 (1,48; 5,25) нг/мл при показателе у здоровых лиц от 0 до 2,28 нг/мл.

Известно, что экспрессия галектина-3 возрастает по мере прогрессирования фиброза и воспаления [7]. У большинства обследованных больных ХГС активность АлАТ была в норме или незначительно повышена, при этом корреляции между уровнем галектина-3 и активностью АлАТ не выявлено ($r = 0,045$, $p = 0,693$).

Достоверно более высокий уровень галектина-3 обнаружен у пациентов с минимальным фиброзом

Таблица 5
Активность АлАТ при разной вирусной нагрузке и степени фиброза печени

Активность АлАТ, Ед/л	Вирусная нагрузка (МЕ/мл), % больных		Степень фиброза, % больных	
	<500 000 (n=27)	≥500 000 (n=33)	$F_0 - F_1$ (n=51)	$F_2 - F_4$ (n=20)
В пределах нормы	48,2	21,2	35,3	30,0
41–80	37,0	33,3	35,3	30,0
81–120	7,4	21,2	15,7	20,0
Более 120	7,4	24,3	13,7	20,0

Таблица 6
Частота повышения уровня галектина-3 на разных сроках развития ХГС

Продолжительность заболевания, лет	Уровень галектина-3, % больных		
	в норме	<2,28 нг/мл	≥4,56 нг/мл
Меньше 3 (n=21)	42,9	19,0	38,1
Больше 8 (n=27)	25,9	29,6	44,5

$F_0 - F_1$ печени – 3,94 (1,85; 5,52) нг/мл, по сравнению с тяжелым фиброзом и циррозом печени $F_2 - F_4$ – 2,70 (1,0; 4,56) нг/мл ($p = 0,096$).

Средний уровень галектина-3 у пациентов на ранних сроках развития ХГС был ниже 2,31 (1,23; 5,94) нг/мл, чем при продолжительности ХГС более 8 лет – 4,13 (1,37; 5,3) нг/мл ($p = 0,53$). При большей продолжительности ХГС (более 8 лет) чаще обнаруживали повышенные (29,6%) и высокие (44,5%) показатели галектина-3 в сравнении с таковыми при ранних сроках развития заболевания (табл. 6).

Вместе с тем повышенный уровень галектина-3 в крови независимо от сроков развития заболевания чаще встречался при минимальном фиброзе печени (табл. 7).

Как видно из данных табл. 7, на ранних сроках заболевания повышенный уровень галектина-3 чаще встречается при высокой вирусной нагрузке (66,7%) в сравнении с низкой (50%); при ХГС продолжительностью более 8 лет – наоборот, соответственно 83,3 и 71,4%. Можно предположить, что по мере прогрессирования ХГС на уровень галектина-3 оказывают влияние преимущественно хроническое воспаление или фиброз или сочетание этих процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Типичное малосимптомное течение ХГС не сопровождается значимыми различиями общепринятых оценочных характеристик гепатита (активности АлАТ, вирусной нагрузки, стадии фиброза печени) на ранних сроках развития и при продолжительном течении заболевания. Выявлена умеренной силы корреляция между активностью АлАТ и вирусной нагрузкой и слабой силы – с продолжительностью заболевания.

Имеется тенденция к более высоким показателям уровня галектина-3 при длительном течении

ХГС в сравнении с ранними сроками его развития, при этом достоверно выше средний уровень галектина-3 у пациентов с минимальным фиброзом печени ($F_0 - F_1$), по сравнению с продвинутыми стадиями, что позволяет предположить его важное значение в пусковых и инициальных механизмах его развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вельков В. В. Сывороточные биомаркеры фиброза печени: до свидания, биопсия? – М.: Lomonosoff Print, 2009. – 40 с.
2. Драпкина О. М., Деева Т. А. Прогностическое значение определения уровня галектина-3 у пациентов с метаболическим синдромом и неалкогольной жировой болезнью печени // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2015. – Т. 14. – № 5. – С. 40–47.
3. Павлов Ч. С., Глушенков Д. В., Ивашкин В. Т. Современные возможности эластографии, Фибро- и АктиТеста в диагностике фиброза печени // Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2008. – Т. 18. – № 4. – С. 43–52.
4. Friedman S. L. Liver fibrosis – from bench to bedside // J. Hepatol. – 2003. – № 38. – Suppl. 1. – P. 38–53.
5. Henderson N. S., Maskinnon A. C., Farnsworth S. L. et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation in hepatic fibrosis // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2006. – Vol. 103 (13). – P. 5060–5065.
6. Hope V. D. Prevalence and estimation of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association / V. D. Hope, I. Eramova, D. Capurro, M. C. Donoghoe // Epidemiol. Infect. – 2014. – Vol. 142. – № 2. – P. 270–286.
7. Kramer F. Galectin-3: clinical utility and prognostic value in patients with heart failure // Research Reports in Clinical Cardiology. – 2013. – № 4. – P. 13–12.
8. Lee U. E., Friedman S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. – 2011. – Vol. 25. – № 2. – P. 195–206.
9. Yang Ri-Yao, Rabinovich Gabriel A, Liu Fu-Tong. Galectins: structure, function and therapeutic potential // Expert Reviews in Molecular Medicine, Published online. – 2008. – Vol. 10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S1462399408000719>.

РЕЗЮМЕ

Н. С. Жевнерова, Т. В. Антонова, В. А. Ковалева
Клинико-лабораторная характеристика хронического гепатита С на ранних сроках развития

Цель работы – оценка клинико-лабораторных показателей у больных ХГС на ранних сроках развития и их сопоставление с уровнем галектина-3. Обследованы 78 больных ХГС с малосимптомным течением заболевания и минимально выраженным фиброзом печени в большинстве случаев. У большинства больных со сроками заболевания более 8 лет вирусная нагрузка была более 1 000 000 копий/мл. У 10% пациентов на ранних сроках заболевания были обнаружены изменения, соответствующие тяжелому фиброзу печени и циррозу F_3 и F_4 . Выявлена умеренной силы корреляция активности АлАТ с ви-

Таблица 7
Частота повышения уровня галектина-3 у пациентов с разной продолжительностью ХГС в сопоставлении с другими характеристиками

Показатель		Больные с повышенным уровнем галектина-3, %	
		до 3 лет	более 8 лет
Активность АлАТ, Ед/л	В норме	55,6	57,1
	Повышена >120	50,0	66,7
Вирусная нагрузка	<500 000 МЕ/мл	50,0	83,3
	≥500 000 МЕ/мл	66,7	71,4
Степень фиброза	$F_0 - F_1$	62,5	81,2
	$F_2 - F_4$	25,0	60,0

русной нагрузкой и слабой силы — с продолжительностью заболевания. Имеется тенденция к более высоким показателям уровня галектина-3 при длительном течении ХГС в сравнении с ранними сроками его развития, при этом достоверно выше средний уровень галектина-3 у пациентов с минимальным фиброзом печени ($F_0 - F_1$) по сравнению с продвинутыми стадиями, что позволяет предположить его важное значение в пусковых и инициальных механизмах фиброгенеза.

Ключевые слова: хронический гепатит С, галектин-3, фиброз печени.

SUMMARY

N. S. Zhevnerova, T. V. Antonova, V. A. Kovaleva

Clinical and laboratory characteristics of chronic hepatitis C on the early stages of development

Aim of the research — to assess the clinical and laboratory parameters in patients with chronic hepatitis C (CHC) on the early stages of development and their comparison with the level of galectin-3. The study included 78 patients with oligosymptomatic course of the disease and minimal liver fibrosis in the most cases. In the most patients with stages of the disease exceeding 8 years, viral load was over a million copies/ml. In 10 % of patients on the early stages of the disease, changes corresponding to severe liver fibrosis and cirrhosis F_3 and F_4 were detected. Moderate correlation of ALT activity, viral load and low severity with the duration of the disease was identified. There is a trend towards a higher level of galectin-3 in a long course of CHC in comparison with earlier stages of its development, with significantly higher average level of galectin-3 in patients with minimal liver fibrosis ($F_0 - F_1$) as compared to advanced stages, suggesting its importance in the launching and initial mechanisms of fibrogenesis.

Keywords: chronic hepatitis C, galectin-3, liver fibrosis.

© Коллектив авторов, 2016 г.
УДК 616-006.484-053.32

**П. С. Солтан, Ф. В. Моисеенко,
В. Н. Очколяс, В. Ю. Старцев**

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ У ДЕТЕЙ

ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург; Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН; Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова; Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

ВВЕДЕНИЕ

Внутричерепные опухоли представляют собой группу наиболее частых солидных опухолей у детей. Ежегодно выявляется 4,3 случая первичных опухолей головного мозга (ОГМ) на 100 000 детей, более 40 % неоплазм представлены глиомами низкой степени злокачественности [11, 12, 23]. Стандартное лечение детей с глиальными опухолями включает максимально радикальное хирургическое удаление новообразования, а также адъювантную лучевую (ЛТ) и лекарственную терапию (ХТ) [13]. Несмотря на использование современных методов диагностики и лечения, 5-летняя выживаемость пациентов не превышает 5 — 10 %, и рецидивирование опухоли в ближайшие сроки после специализированного лечения в большинстве случаев признается неизбежным [15, 21]. К одной из причин невысоких результатов терапии этих больных относят невозможность интраоперационного удаления микроскопических очагов, не визуализируемых с помощью современных диагностических методик [5, 13, 18].

В настоящее время наиболее перспективным лечебным подходом при ОГМ считают комбинированное использование таргетных препаратов, блокирующих различные сигнальные каскады, что играет определяющую патогенетическую роль для остановки развития опухоли [21]. Сегодня известно, что патогенез глиом, как и других солидных опухолей, обусловлен различными биологическими процессами, основанными на активации различных сигнальных каскадов. Наиболее изучены в этой группе рецепторы ростовых факторов, а также основы ангиогенеза. Однако результаты многочисленных исследований с использованием лекарственных средств с таргетным механизмом действия, с учетом специфической мишени, но без предварительной селекции больных, не показали значимых результатов [26].

Комплексная оценка профиля молекулярно-генетических нарушений считается крайне перспективным направлением для выбора оптимальной терапии [22]. Результаты исследований, проведенных у больных взрослого возраста с ОГМ, позволили выявить многочисленные нарушения активности сигнальных каскадов и, как следствие, значительное число потенциальных мишеней для таргетных препаратов [2, 3].

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным изучить профиль молекулярно-генетических нарушений при ОГМ у детей с целью определения потенциальных кандидатов для лекарственной терапии с направленным механизмом действия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 30 больных (20 (66 %) мальчиков и 10 (34 %) девочек), средний возраст — 9,9 года (от 1 до 17 лет). Повторный анализ всех удаленных опухолей выполнен независимым сертифици-